



TITLE:

部位特異的変異法によるホスホエ
ノールピルビン酸カルボキシラー
ゼの構造 - 機能相関に関する研究(
Dissertation_全文)

AUTHOR(S):

寺田, 和豊

CITATION:

寺田, 和豊. 部位特異的変異法によるホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼの構造 - 機能相関に関する研究. 京都大学, 1992, 博士(理学)

ISSUE DATE:

1992-03-23

URL:

<https://doi.org/10.11501/3088563>

RIGHT:

許諾条件により本文は2011-04-01に公開

②

学位申請論文

論文題目：

部位特異的変異法によるホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼの
構造－機能相関に関する研究

申請者 寺田和豊

京都大学大学院

理学研究科（化学専攻）

博士後期課程

（平成4年3月研究指導認定見込）

目次

第 I 章 序論

I - 1	はじめに	1
I - 2	部位特異的変異法	
	(1) 合成オリゴヌクレオチドを用いた 部位特異的変異の導入方法	2
	(2) 部位特異的変異導入法による酵素の研究例	4
I - 3	アロステリック酵素の分子機構	6
I - 4	ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ	
	(1) 概要	8
	(2) PEPCにおける化学修飾による研究	12
	(3) PEPCの構造的知見	13
I - 5	本研究の背景と目的	17
I - 6	本研究の内容	
	(1) His579が触媒・制御機能において果たす役割	18
	(2) His138が触媒機構において果たす役割	19

第 II 章 材料と方法

II - 1	試薬類	20
II - 2	大腸菌の菌株とプラスミド	21
II - 3	大腸菌の培養	22
II - 4	基本的な遺伝子操作	23
II - 5	Eckstein法による His579の置換	
	(1) 合成オリゴヌクレオチドの調製	24
	(2) 部位特異的変異の導入	25
	(3) 変異株の確認	27
	(4) 変異 DNA断片のものとプラスミドへの導入	27
II - 6	PCR法による His138の置換	29
II - 7	蛋白質の定量および分光学的方法による酵素活性の測定	31
II - 8	リン酸遊離活性のリンモリブデン酸法による測定	31

II - 9	HCO ₃ ⁻ を含まない試薬類の調製	3 2
II - 1 0	PEPCの精製	
	(1) 野生型酵素の精製	3 2
	(2) 変異型酵素の精製	3 3
II - 1 1	ウェスタン・ブロッティング	3 4

第III章 結果

III - 1	変異型酵素の発現	3 5
III - 2	H 5 7 9 NとH 5 7 9 Pの部分精製	3 8
III - 3	H 1 3 8 NとH 5 7 9 Nの均一精製	3 9
III - 4	変異型酵素の分子的性質	4 4
III - 5	His579置換体の酵素学的性質	
	(1) 速度論的性質	4 8
	(2) 酵素活性の pH依存性	5 2
	(3) アロステリック・エフェクターに対する感受性	5 2
	(4) ジエチルピロカーボネートによる変異型酵素の失活	5 8
III - 6	His138置換体の酵素学的性質	
	(1) ビルビン酸生成活性の検出	5 9
	(2) 速度論的性質	6 3
	(3) アロステリック・エフェクターに対する感受性	6 4

第IV章 考察

IV - 1	His579の役割	6 5
IV - 2	His138の役割	6 8
IV - 3	¹ H-NMRによる PEPCの解析の試み	7 1

謝 辞	7 5
-----	-----

文 献	7 6
-----	-----

本論文で用いた略号

bp	塩基対
CoASAc	アセチル-CoA
DCDP	3,3-ジクロロ-2-ヒドロキシフオスフィノイルメチル-2-プロペノエート
DEAE	ジエチルアミノエチル
dNTP	dATP、dCTP、dGTP、dTTP
dsDNA	二本鎖DNA
FBP	フルクトース 1,6-ビスリン酸
FPLC	高速蛋白質液体クロマトグラフィー
HPLC	高速液体クロマトグラフィー
kb	10 ³ 塩基対
NADH	ニコチンアミド-アデニンジヌクレオチド (還元体)
NMR	核磁気共鳴
OAA	オキサロ酢酸
PAGE	ポリアクリルアミドゲル電気泳動
PCR	ポリメラーゼ連鎖反応
PEP	ホスホエノールピルビン酸
PEPC	ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ
Pipes	ピペラジン-N,N'-ビス (2-エタンスルホン酸)
ppGpp	グアノシン 3'-二リン酸 5'-二リン酸
SDS	ドデシル硫酸ナトリウム
ssDNA	一本鎖DNA
Taps	N-トリス (ヒドロキシメチル) メチル-3-アミノプロパンスルホン酸
Tris	トリスヒドロキシメチルアミノメタン

本論文で用いた記号の定義

$S_{0.5}$	酵素活性の最大速度の半分を与えるに必要な基質の濃度
$A_{0.5}$	酵素活性の最大速度の半分を与えるに必要な活性化剤の濃度
$I_{0.5}$	酵素活性の最大速度の半分を与えるに必要な阻害剤の濃度

- * 酵素・蛋白質名の表示には原則として英語を用いた。
- * 図、表、式は、標題ならびに説明文を除き英語で記した。
- * 蛋白質のアミノ酸残基を一次構造上の位置を示して表す場合は、3文字表記によりアミノ酸残基を示し、つづいてアミノ末端からの位置を示した。
例； アミノ末端から579番目のヒスチジン残基 — His579
- * 酵素中の1つのアミノ酸残基を別のアミノ酸残基に置換した変異型酵素は、1文字表記によって置換する前のアミノ酸残基、数字によって位置、1文字表記によって置換後のアミノ酸残基の順番で示した。
例； 579番目のヒスチジン残基 (H) をアスパラギン (N) に置換した変異型酵素 — H579N

第 I 章 序 論

I - 1 はじめに

酵素の構造と機能の相関を明らかにすることは、生化学の重要な課題である。全ての生命現象は、個々の素反応の担い手である酵素によって支えられているといっても過言ではない。酵素分子は一般に蛋白質であり、常温・常圧下で高い触媒活性と高い基質特異性を兼ね備えている。またアロステリック酵素のように、生体内の必要に応じてその活性が巧妙に調節を受けている酵素も少なくない。生体機能素子である酵素の触媒能と制御能の分子的機構を解明することは、巧妙な生命現象メカニズムの基盤を理解する上で学問的に重要であるばかりでなく、バイオテクノロジーの発展にとっても重要である。

酵素や蛋白質の構造-機能相関の研究手段としては、化学修飾法が古くから用いられてきた。1950年代には蛋白質の全一次構造が初めて決定され、その後ペプチドの分離精製および分析技術の向上と共に修飾アミノ酸残基の位置を容易に同定できるようになった。1960年代からはX線結晶構造解析の進歩にともなって、さまざまな蛋白質・酵素の立体構造が明らかになり、構造と機能の相関を論じる時代が到来した。さらに最近ではNMRの進歩にともない、溶液状態のままで分子量数万までの蛋白質・酵素の構造決定や特定の残基が果たす役割を検討できるようになりつつある。しかし構造解析法の進歩にともなって、化学修飾法の問題点が指摘されるようになった。化学修飾法は、ある立体空間を占める置換基を導入するので、修飾によって機能の喪失がもたらされても、ただちには修飾残基がその機能に直接関与していることにはならない。さらに化学修飾法は、限られた官能基しか対象とできず、対象となる場合にも、たいていの修飾試薬は一つ以上の残基と反応してしまうことが多い。化学修飾法に代わる構造-機能相関の解析法としては、突然変異によって偶然得られた変異型酵素を解析する方法が行われていた。しかし、突然変異を選択的に導入することは不可能であり、膨大な種類の変異型酵素を一つ一つ解析して、機能的に重要なアミノ酸残基を特定するのは必ずしも容易でなかった。

これらの問題点は、最近確立した部位特異的変異法によって解消された。

部位特異的変異法は、クローン化された遺伝子の翻訳領域中の特定のコードンを、予め指定した別のコードンに置換して変異型遺伝子を構築する方法であり、こうして得られた変異型遺伝子を発現すると、対応するアミノ酸残基が置換した変異型酵素が得られることになる。しかし部位特異的変異法を行うためには、どのアミノ酸残基を置換するか予め決めなければならない。高次構造が決定されていない多くの酵素の場合、機能的に重要であると予想されるアミノ酸残基を特定するには、化学修飾法による知見が重要な役割を果たすことになる。さらにこれを補う方法としては、異種生物間の酵素の一次構造を比較して保存されたアミノ酸残基を検索する方法がある。進化的に保存されたアミノ酸残基は、機能上重要であることも多い。

本研究は、さまざまなエフェクターを有するアロステリック酵素である大腸菌のホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ (PEPC) [EC 4.1.1.31]¹⁾ を材料として、機能上重要と考えられる2つのヒスチジン残基の置換を部位特異的変異法により行い、得られた変異型酵素を解析した。以下、序論では、本研究の基礎となる知見として、部位特異的変異法とその適用によって解析の行われた酵素、原子レベルでの制御機構が明かとなったアロステリック酵素について概観し、PEPCの研究状況について述べる。

1-2 部位特異的変異法

(1) 合成オリゴヌクレオチドを用いた部位特異的変異の導入方法

部位特異的変異法では、望むような配列を有するオリゴヌクレオチドが必要である。部位特異的変異を行った最初の実験は Smithらによって1978年に報告されている²⁾。彼らは polynucleotide phosphorylaseを用いて短いオリゴヌクレオチドを合成して ϕ X174ファージの一本鎖DNAにハイブリダイズさせて、DNA polymeraseで二本鎖DNAに延長してから大腸菌に導入して変異型ファージを得た。その後、化学的にオリゴヌクレオチドを合成する技術は飛躍的に進歩して^{3,4)}、現在では50から100ヌクレオチドの鎖長のオリゴヌクレオチドをほぼ均一に合成できるようになった。

部位特異的変異導入法は、主として M13ファージの一本鎖 DNAを用いたシングルプライマー法⁵⁾を基本として改良がなされてきた⁶⁻⁹⁾。

しかし、いずれの方法も変異導入部位の塩基対が正しく対合していないヘテロな二本鎖DNAのままで大腸菌内に導入するために、菌体内の修復機構が働いて、得られる変異株は野生株の数%以下にとどまる場合が多かった。したがって変異株を単離するためにはブランク・ハイブリダイゼーションなどのスクリーニングが通常必要である。変異効率の大幅な向上に成功したのは Kunkelの方法¹⁰⁾と Ecksteinの方法^{11,12)}である。Kunkel法では deoxyuridine triphosphataseと uracil glycosylaseの欠損株を宿主に用いて、チミジンの代わりにウリジンを含んだ鋳型一本鎖DNAを調製して *in vitro*でヘテロな二本鎖DNAを合成し、形質転換後 *in vivo*で変異型のDNA鎖が選択的に残るように工夫した方法である。Eckstein法の特徴は変異導入用のプライマーを用いて二本鎖DNAを合成する際に dCTPの代わりに dCTP α S (図1)を用いることである。こうして合成した二本鎖DNAのうち、チオールヌクレオチドのはいったDNA鎖は表1に示した一群の制限酵素による切断を受けない¹³⁾。もう一方の鋳型であったDNA鎖は、表1の制限酵素による切断を受けて、ニックが入ることになる。

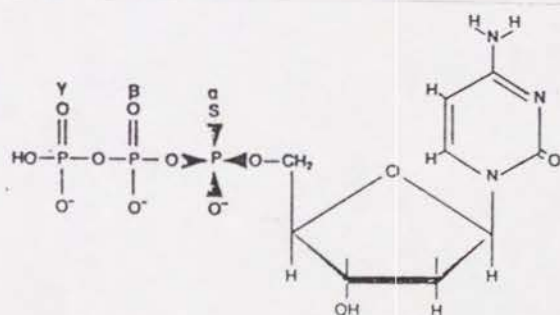


図1 dCTP α Sの構造 (文献 14より転載)

表1 チオールヌクレオチドを切断しない制限酵素

AvaI, AvaII, BanII, HindII, NciI, PstI, PvuI

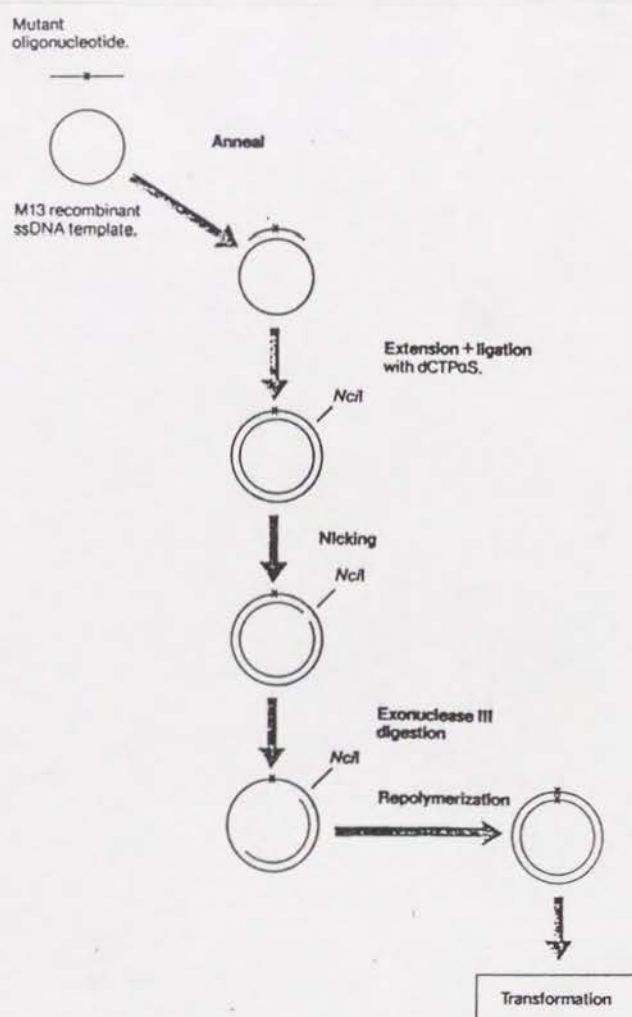


図2 Eckstein法 (文献 14より改変)

その後、exonuclease IIIによって鋳型だった一本鎖DNAを分解し、続いてデオキシヌクレオチドの入ったDNA鎖を新しい鋳型としてT4 DNA ligase存在下にDNA polymerase Iを用いて再び二本鎖DNAを合成すると *in vitro* で変異型のホモの二本鎖DNAが得られることになる(図2参照)。これら2つの方法は操作がやや煩雑であるものの変異効率が80%以上と飛躍的に向上しており、一本鎖DNAを鋳型とした部位特異的変異法は一応の完成をみたといえる。これに対して最近では、耐熱性DNA polymeraseを用いて連鎖的に特定のDNA断片を増幅する方法(polymerase chain reaction、PCR法)が考案され部位特異的変異導入法としても応用されはじめている^{15,16)}。

(2) 部位特異的変異導入法による酵素の研究例

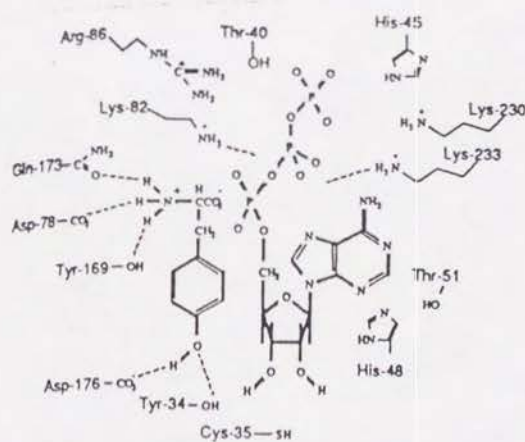
1980年代にはいつ頃から部位特異的変異導入法によって構造-機能相関の研究が行われた酵素は主として、すでに全一次構造およびX線結晶構造解析によって高次構造が解明された酵素であった。このような解析のなされた酵素をGerltは(i)触媒部位に近接して結合エネルギーに影響を与えたり、基質の特異性に影響を与えているアミノ酸残基の置換例、(ii)一般酸・塩基触媒もしくは求核性触媒として直接的な働きを行うと考えられるアミノ酸残基の置換例、と2つの範疇に分けてその成果を詳細にまとめている¹⁷⁾。

このなかでも(i)で述べられている tyrosyl-tRNA synthetaseに関する Fershtらの研究は、遷移状態での中間体を安定化する上で重要と考えられる結合エネルギーを定量的に評価し、特定のアミノ酸残基-基質間の相互作用を考察した点で大変興味深い。Tyrosyl-tRNA synthetaseは tyrosineとATP、tRNA^{tyr}からアミノアシル-tRNAを形成する酵素である。Fershtらは1段階目の部分反応の、活性化された酸無水物である tyrosyl-AMPと酵素複合体の形成反応で、活性部位に存在する14個の残基を系統的に置換し、それらの置換がもたらす高次構造への影響を基質の結合エネルギーと速度定数との間に成り立つ自由エネルギーの直線性によって評価した上で、それぞれの残基が果たす役割を検討している¹⁸⁻²²⁾(表2、図3参照)。

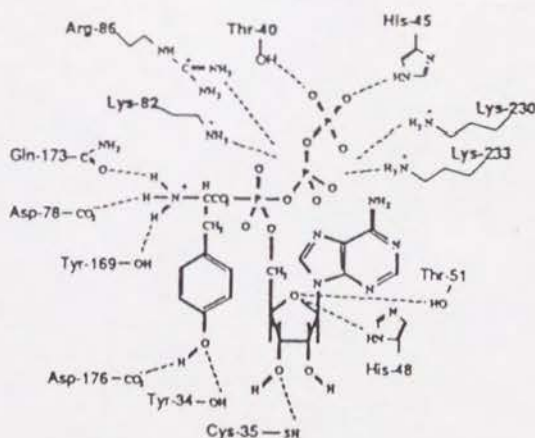
表2 Tyrosyl-tRNA synthetaseの側鎖と基質との相互作用エネルギー（文献 21より転載）

residue	interaction energy of side chains* in complex with				
	Tyr	ATP	[Tyr-ATP] [‡]	PP _i	Tyr-AMP
Tyrosine Binding Site					
Tyr-34	+	0	+	0	+
Asp-78	++++	++*	++++	++*	++++
Tyr-169	++++	0	++++	0	++++
Gln-173	++++	++*	++++	+	++++
Nucleotide and Pyrophosphate Site					
Cys-35	0	0	++	0	+++
Thr-40	0	0	++++	++++	0
His-45	0	0	++++	++++	0
His-48	0	0	+++	0	+++
Thr-51	0	0	0	0	-
Lys-82	0	++	++++	++++	0
Arg-86	0	0	++++	++++	-
Asp-194	0	0	++++	+	+++
Lys-230	0	0	++++	++++	0
Lys-233	0	++++	++++	++++	0

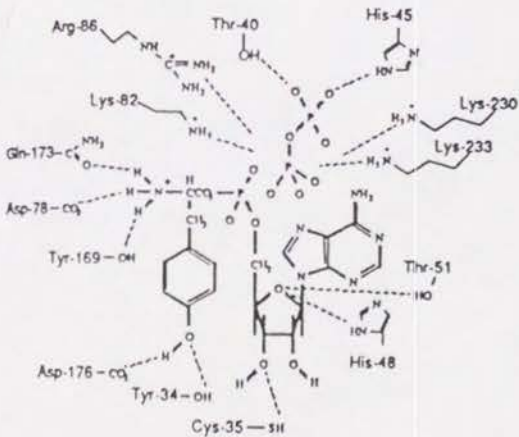
* Apparent stabilization energy from the side chain in kcal/mol: 0 = -0.5 to +0.5; + = 0.5-1.0; ++ = 1.0-1.5; +++ = 1.5-2.0; ++++ = >2.0; - = -0.5 to -1.0; * = evidence for some disruption of protein structure on mutation.



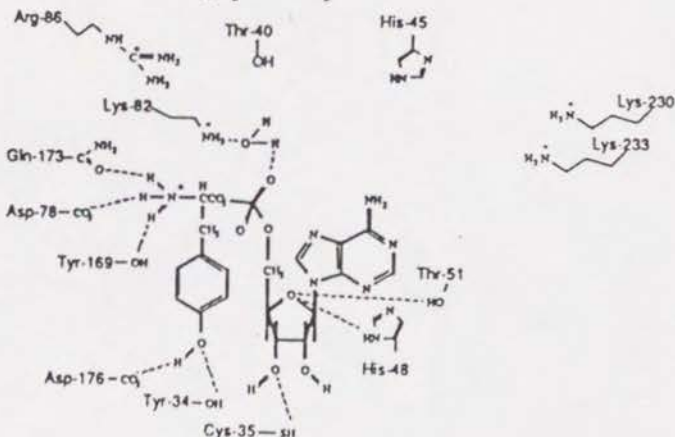
E.Tyr.ATP



E[Tyr-ATP][‡]



E.Tyr-AMP.PP_i



E.Tyr-AMP

図3 E-Tyr·ATP複合体から E·Tyr-AMP複合体への形成段階（文献 21より転載）

(ii)の例としては、結晶構造解析から活性部位に位置し、触媒反応に直接関与していると考えられたアミノ酸残基が、部位特異的変異法によって否定された例がある。Carboxypeptidase Aでは Tyr248が活性に必須な残基と考えられていた。Tyr248の水酸基は加水分解されるペプチド結合の-NH-にプロトンを与え、Glu270のカルボキシル基がカルボニル炭素に求核攻撃する、もしくは一般塩基触媒として作用すると考えられていた。しかしながら、この Tyr248を置換した変異型酵素は活性を有しており、Tyr248は活性に必ずしも不可欠ではなく、基質の結合に部分的に関与しているものと結論された^{23, 24)}。RNase T1でも結晶構造解析や化学修飾による研究から活性に必須と考えられた Glu58を置換しても、活性を有していたことから、この残基が不可欠ではないことが明らかにされている^{25, 26)}。

このように、化学修飾法をはじめとする従来の研究から示唆されていた必須アミノ酸残基の役割を部位特異的変異法によって検証し、高次構造に関する情報の得られている酵素については、活性部位に存在する任意の残基を置換して、それぞれの残基の役割を一つ一つ解明することが可能になった。高次構造に関する情報が乏しい酵素については、部位特異的変異法と化学修飾を相補的に用いて機能部位を特定する試みが、さまざまな酵素で行われはじめている。

1-3 アロステリック酵素の分子機構

蛋白質・酵素のアロステリック性は概念的に Monod, Wyman, Changeux によって提唱された「協奏転移モデル」²⁷⁾によるか、Koshlandらによる「逐次転移モデル」²⁸⁾によって解釈されてきた。アロステリック蛋白質・酵素は複数の異なる安定なコンフォメーションを可逆的にとることによって、生物学的に大変重要な機能の調節を巧妙に行っている。これら2つのモデルは主として速度論的解析による妥当性によって支えられてきた。直接的な根拠となるX線結晶解析による構造的知見は、唯一 haemoglobinで行われていただけであったが、最近いくつかの酵素でコンフォメーションの異なる結晶が解析され、アロステリック性の分子的基盤が原子レベルで明かとなってきた。

Haemoglobinではリガンドの結合によって三次構造やヘムの環境が微視的に変化することが明かとなっている。これらの変化はサブユニット間の相互作用を介して他のサブユニットに伝達され、酸素結合能を変えている。このとき四次構造的には、サブユニット間での回転を引き起こすことが知られていた。サブユニット間での回転によるアロステリック転移の伝達様式は、最近明らかになったいくつかのアロステリック酵素においてもみられる。

大腸菌の aspartate transcarbamylase は 2 種類のサブユニットからなるが、基質が触媒サブユニットに結合して引き起こされるホモトロピックな協同性と CTP、UTP、ATP などのエフェクターが制御サブユニットに結合して引き起こされるヘテロトロピックな協同性を示すことが知られている。最近、基質に対する親和性の強い R 状態と弱い T 状態の X 線結晶構造解析がなされ^{29, 30)}、haemoglobin の場合と同様にサブユニット間の回転による四次構造の大きな変化が起きていることが明かとなった (図 4)。構造解析からホモトロピックな協同性に重要と考えられた残基間の相互作用を検証するために、部位特異的変異法によって作製した多数の変異型酵素が解析され³¹⁾、図 5 に示すような相互作用が同定された。このなかでも特に、触媒サブユニットの 230-245 番目の残基周辺に見いだされるループ構造は、R と T 状態で非常に大きなコンフォメーション変化を起こし、それぞれのコンフォメーションの安定化に決定的な役割を果たしていること

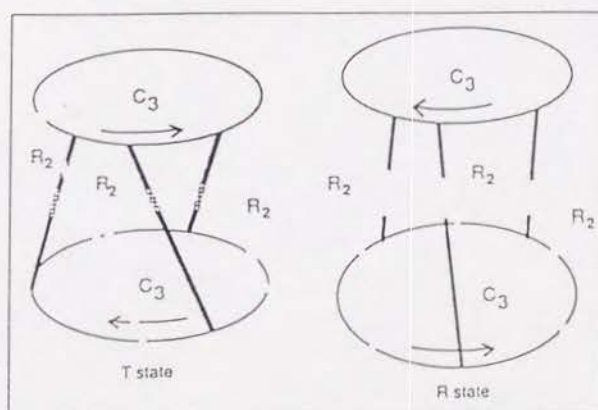


図 4 Aspartate transcarbamylase のアロステリック転移を示す模式図 (文献 31 より転載) T 状態におけるサブユニット間の Glu239 と Lys164、Tyr165 の相互作用を網目で、240 番目の残基周辺のループを黒線で示す。制御サブユニットは触媒サブユニットを示す 2 つの楕円を結んだ灰色の線で示す。

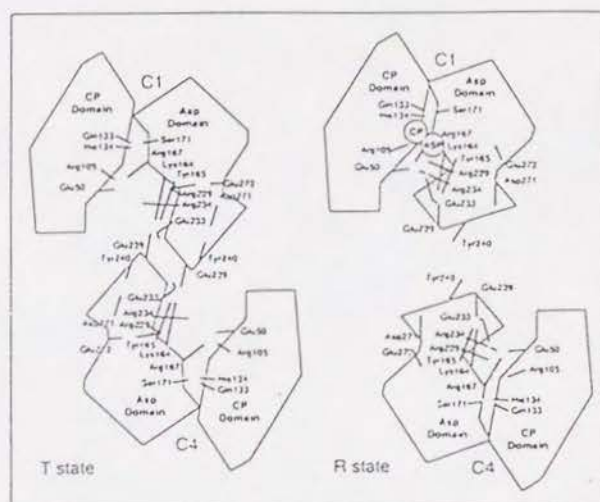


図 5 部位特異的変異法によって同定された aspartate transcarbamylase のアロステリック転移の際に重要な相互作用 (文献 31 より転載) 簡潔に示すため C1 と C4 サブユニットのみ示す。

が示された。制御サブユニットを介したヘテロトロピックな協同性に関しても同様な解析が進行しつつある³²⁻³⁴⁾。細菌の phosphofructokinaseでも、2量体-2量体間でRとT状態の変化にともなって回転が起こり、この回転軸に対して垂直面にあるサブユニット間で形成される活性部位に位置する Arg残基の配向が、基質の親和性に決定的な役割を果たしていることが明かとなっている^{35,36)}。

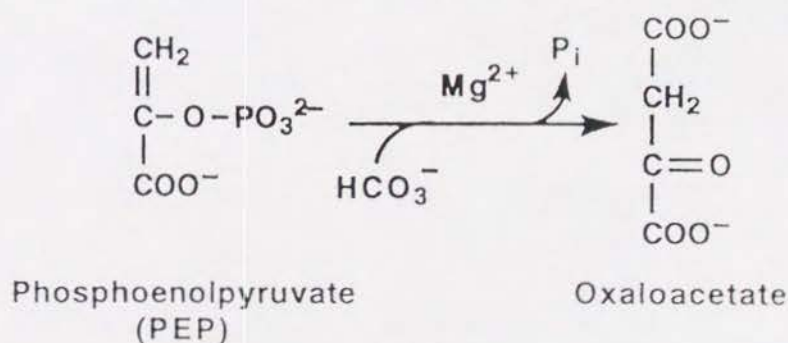
Glycogen phosphorylaseでは不活性なb型から活性化されたa型に移行するときアミノ末端近傍の Ser14がリン酸化される。それぞれの型のRとT型の結晶構造解析がなされた結果、b型からa型へ移行するとき、三次構造上ではリン酸化によってN末に新たな α -ヘリックスが形成され、サブユニット間の相互作用の新たな形成と破壊が起きていた。四次構造ではあまり大きな構造変化がみられなかったが、2つのサブユニット間の対称面で僅かな回転が起きていた³⁷⁻⁴⁰⁾。

以上述べてきたように、アロステリック効果の発現において高次構造上に現れる変化が、残基間の相互作用を通じて理解されつつあり、アロステリック効果を説明する2つの理論の妥当性が論じられはじめている。

1-4 ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ

(1) 概要

Phosphoenolpyruvate carboxylase [EC 4.1.1.31] (PEPC)は、 Mg^{2+} 存在下でホスホエノールピルビン酸 (PEP)に炭酸水素イオンを固定し、オキサロ酢酸 (OAA)を生成する反応を触媒する酵素である^{1,41,42)} (式1)。



式1 PEPCが触媒する反応

正反応の ΔG (25 °C) は -30.1 kJ/mol と計算されており⁴³⁾、本質的に不可逆である。

本酵素は全ての高等植物、多くの原生動物および細菌類に存在する⁴⁴⁾。本酵素は主として Krebs サイクルにオキサロ酢酸を供給することにより、補充的な (anaplerotic) 役割を果たすものとされている^{45, 46)}。またトウモロコシなどの高い光合成能を有する C_4 植物では PEPC のアイソザイムが存在し、初期炭酸固定酵素として光合成の中心的役割を果たしている⁴⁷⁾。サボテンやベンケイソウなどの CAM 代謝 (Crassulacean acid metabolism) を行う植物では、夜間の呼吸によって生じる CO_2 を PEPC によって有機酸の形で蓄えていることが知られている⁴⁸⁾。この他に PEPC は植物において気孔の開閉や、根における pH の調整、果実においては有機酸の蓄積等の役割を果たしていることが知られている^{49, 50)}。

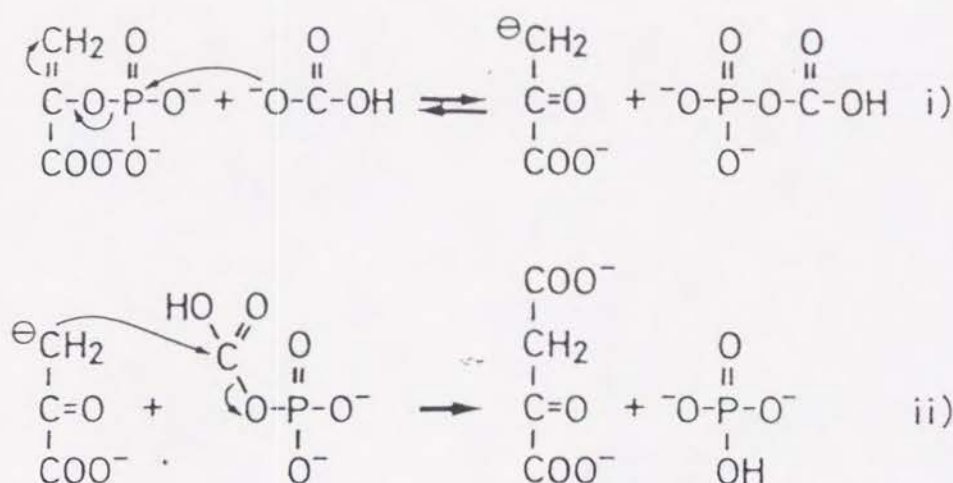
本酵素は一般に分子量 10 万の同種のサブユニット 4 個からなる比較的大きな酵素である。多くの PEPC はアロステリック酵素であり、その活性調節因子は生物種によって多様性に富んでいる。表 3 は 1972 年の Utter らの分類¹⁾に従って、現時点で知られている PEPC をエフェクター (調節因子) の種類によって大別したものである。第 1 はアセチル-CoA (CoASAc) により活性化されるもの、第 2 は C_4 -ジカルボン酸または Krebs サイクルの中間体によって阻害されるもの、第 3 はエフェクターをもたないもの、第 4 はこれらいずれにも属さないものである。本研究で対象とした大腸菌の PEPC は、特に複雑な調節を受ける酵素であり、① CoASAc^{51, 52)} ② フルクトース 1,6-ビスリン酸 (FBP)^{53, 54)} ③ GTP または グアノシン 3'-二リン酸 5'-二リン酸 (ppGpp)⁵⁵⁾ ④ 脂肪酸または脂肪酸の CoA 誘導体⁵⁶⁾ によって活性化を受け、⑤ アスパラギン酸またはリンゴ酸^{57, 58)} によって阻害を受ける。そのほかにジオキサンやエタノールなどの有機溶媒が非生理的な活性化因子となることが知られている⁵⁶⁾。大腸菌の PEPC は以上の 5 種類のエフェクターに対して独立な制御部位をもち⁵⁹⁻⁶³⁾、各エフェクターの結合によって多様な高次構造変化を起こすことが示唆されている⁶⁴⁾。これに対してラン藻の PEPC は、調べられた限りアロステリックなエフェクターをもたない酵素であった⁶⁵⁾。 C_4 植物の 1 つであるトウモロコシの PEPC は、

表3 PEPC の活性調節因子

Class	Source	Activators	Inhibitors
1	<i>Escherichia coli</i>	CoASAc, FBP, GTP(ppGpp), FA [dioxane]	Asp (MA)
	<i>Salmonella typhimurium</i>	CoASAc, FBP, GTP, CDP, [dioxane]	Asp
	<i>Brevibacterium flavum</i>	CoASAc, FBP	Asp
	<i>Streptococcus bovis</i>	CoASAc	Asp
	<i>Thiobacillus thiooxidans</i>	CoASAc	—
	<i>Tetrahymena pyriformis</i>	CoASAc	—
2	<i>Thiobacillus thioparus</i>	—	Asp (MA)
	<i>Euglena gracilis</i>	—	Cit, OAA
	<i>Acetobacter xylinum</i>	—	Suc, ADP
	<i>Acetobacter suboxydans</i>	—	Asp
	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	—	Asp
	<i>Zymomonas mobilis</i>	—	α kg, Cit
	C ₄ -plants		
	monocotyledonous	G6P, Gly	MA (Asp)
	dicotyledonous	G6P	MA (Asp)
	CAM-plants	G6P	MA (Asp)
3	C ₃ -plants	—	—
	<i>Anacystis nidulans</i>	—	—
4	<i>Pseudomonas</i> MA	NADH	—

横線は、該当するエフェクターが見いだされていないことを示す。()はその直前のエフェクターと同一部位に作用すると考えられるものを示す。[]は非生理的なエフェクター化合物。略号 Asp, アスパラギン酸; Cit, クエン酸; α kg, α -ケトグルタル酸; CoASAc, アセチル-CoA; FA, 脂肪酸; FBP, フルクトース 1,6-ビスリン酸; Gly, グリシン; G6P, グルコース 6-リン酸; MA, リンゴ酸; OAA, オキサロ酢酸; ppGpp, グアノシン 3'-二リン酸 5'-二リン酸; Suc, コハク酸

グルコース 6-リン酸、グリシン、リンゴ酸をエフェクターとしてもつ⁶³⁾。そのほかにトウモロコシなどの C₄植物⁶⁷⁻⁶⁹⁾や CAM植物⁷⁰⁻⁷³⁾の初期炭酸固定に関わる PEPCのアイソザイムにおいて、可逆的リン酸化によって活性および制御能の調節が行われている⁷⁴⁾。申請者らはこのリン酸化機構を知る手がかりとして、トウモロコシ PEPCにウシ心臓由来の cAMP依存性プロテインキナーゼを作用させたところリン酸化が起きることを見出し、リン酸化による PEPCの速度論的性質の変化から、*in vivo*におけるリン酸化部位が Ser15であることを推測した(参考論文3)⁷⁵⁾。その後、*in vivo*におけるリン酸化部位も同じであることが報告され⁷⁶⁾、同じ C₄植物



式3 PEPCの段階的反應機構モデル (文献 84より転載)

機構を強く示唆する証拠を得ている⁸⁴⁾。藤田らはさらに段階的反應機構モデルの中間体として想定されるカルボキシリン酸の捕捉を試みたが、果たせなかった⁸⁴⁾。現在まで、PEPCでカルボキシリン酸は捕捉されていないが、1988年に Gonzalezと Andreoが、トウモロコシの酵素でホスホエノール- α -ケト酪酸の $^3\text{H}_2\text{O}$ 中での加水分解を行い、もう一つの間mediateと考えられるピルビン酸のエノール型アニオンの形成を示唆した⁸⁵⁾。

(2) PEPCにおける化学修飾による研究

申請者の研究室では PEPCの”必須”アミノ酸残基を知る手がかりとして大腸菌 PEPCの化学修飾を行っており、システイン⁸⁶⁻⁸⁸⁾、ヒスチジン⁸¹⁾、アルギニン⁸²⁾およびリジン⁸³⁾残基が修飾にともなって酵素活性が失われることを見いだした。特にシステイン残基を修飾したときには、その時間経過やホスホ乳酸による保護効果から、Cys568が活性部位もしくはその近傍に位置するものと推定されている⁸⁸⁾。その他ヒスチジン、アルギニン、リジン残基の修飾によって、活性調節因子に対する脱感作が起こることも知られている。以上の大腸菌 PEPCの化学修飾による知見を表4にまとめた。

そのほかC₄植物のトウモロコシ PEPCやC₄AM植物の PEPCでも化学修飾による研究が行われており、システイン⁸⁹⁾、ヒスチジン^{90,91)}、アルギニン^{92,93)}、リジン^{94,95)}残基が必須アミノ酸残基として報告されている。これらの残基を修飾する際、グルコース 6-リン酸やリンゴ酸などの活性調節因子による保護効果が観察されているが、これらの調節因子に対する脱

表4 大腸菌 PEPCの触媒機能発現に必要なアミノ酸残基

Modified residues	Chemical modifiers	Inactivation	Desensitization	References
Cys	N-ethylmaleimide	+	—	86)
	2-bromopyruvate	+	—	87)
	DACM	+	—	88)
His	photooxidation	+	L-Asp, FBP, GTP	61)
Arg	2,3-butanedione	+	FBP, GTP, L-Asp, CoASAc	62)
Lys	TNBS	+	L-Asp, FBP, GTP	63)

DACM: N-[7-(ジメチルアミノ)-4-メチルマリニル]マレイミド^{*} TNBS: 2,4,6-トリクロロベンゼンスルホン酸

L-Asp: L-アスパラギン酸 FBP: フルクトース 1,6-ビスリン酸

感作が起きているのか否かは不明である。最近、トウモロコシ酵素の Lys 606がピリドキサル 5'-リン酸によって修飾され、酵素活性の喪失をもたらすことが報告されている⁹⁵⁾。

(3) PEPCの構造的知見

申請者の研究室では永年大腸菌の PEPCについての研究が行われており、すでに大腸菌 (*Escherichia coli*)^{96,97)}、ラン藻 (*Anacystis nidulans*)^{98,99)}、トウモロコシ (*Zea mays*)^{100,101)} の PEPCの構造遺伝子もしくは cDNAがクローニングされ、その全塩基配列が決定された。以後、ここ数年間でグルタミン酸醗酵菌 (*Corynebacterium glutamicum*)^{102,103)}、C₄植物の一つであるモロコシ (*Sorghum vulgare*)^{104,105)}、CAM植物の一種 (*Mesembryanthemum crystallinum*)¹⁰⁶⁻¹⁰⁸⁾、C₃植物のタバコ培養細胞 (*Nicotiana tabacum*)¹⁰⁹⁾、と4種類の生物種からアイソザイムを含む7種類の PEPCが様々なグループによってクローニングされた。

図6は大腸菌、ラン藻、トウモロコシ PEPCの一次構造をできるだけ一致するように配列して比較したものである。比較的相同性の高い領域は、大腸菌の PEPCの番号で、133-146、245-260、390-409、422-442、575-601、711-739、863-883番目の領域である。これらの領域のアミノ酸配列は最近までに報告された7つの PEPCにおいてもよく保存されている。化学修飾の結果から、システイン、ヒスチジン、リジン、アルギニン残基が活性発現に必須と考えられているが、ヒスチジン残基は2カ所 (大腸菌で138と579番目。402番目

図7は大腸菌とラン藻の、図8はトウモロコシ PEPCのハイドロパシープロファイルを示す^{110, 111)}。これらの図から疎水性の比較的強い領域（点線より上）と親水性の比較的強い領域（点線より下）が互いに入り交じっていることがわかる。このことから PEPCサブユニットには特に大きな疎水的コアはなく、疎水性部分と親水性部分の両方をもつドメインが寄り集まっ

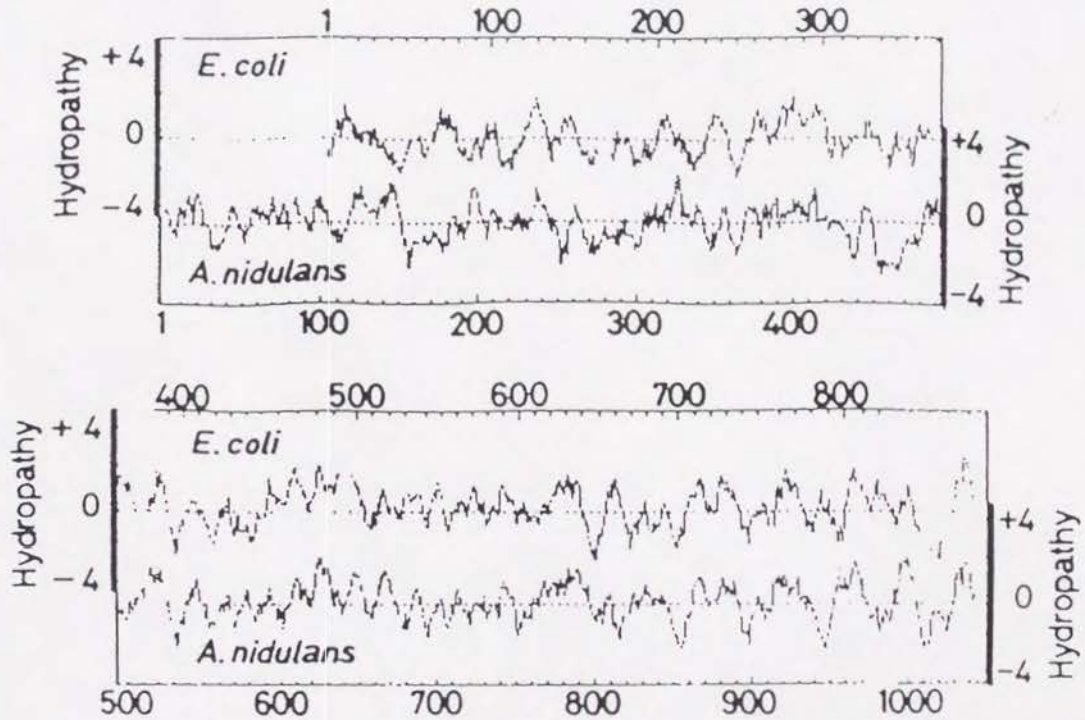


図7 大腸菌とラン藻の酵素のハイドロパシープロファイル（文献 111より転載）

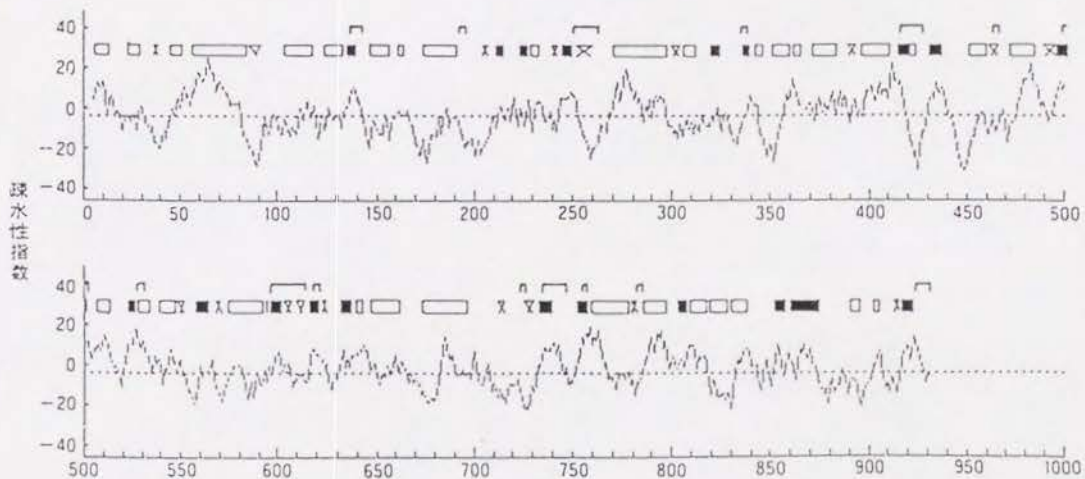


図8 トウモロコシ酵素のハイドロパシープロファイルと予想二次構造（文献 110より転載）
□は α -ヘリックス、■は β -シート、×は β -ターンの予測される部位。□は3種の酵素においてその配列がよく保存されている領域。

ているような構造をとるものと予測される。大腸菌酵素の二次構造の予測では⁹⁷⁾、比較的 α -ヘリックスと β -シート構造を交互にとっていることが予測されている。この観点から、酵素の折り畳み構造のモチーフの1つである α/β パレル構造¹¹²⁾を PEPCがとっている可能性も考えられる。興味深いことに α/β パレル構造をもつ解糖系酵素のうち、PEPを基質とする enolase と pyruvate kinase が、共通の祖先酵素から進化したという説が提唱されている¹¹³⁾。

図6で示した3種の PEPCの間では、アミノ末端側半分よりもカルボキシル末端側半分の相同性が10%程度高かったが、比較の組合せをみるとアロステリック酵素である大腸菌とトウモロコシの PEPC間の相同性に比べて、非アロステリック酵素であるラン藻の PEPCとの相同性が低かった。図9は大井らによって開発されたプログラムによって、3種の PEPCのアミノ酸配列から三次構造のホモロジーを求めた結果をマトリックス法で示したものであるが、アミノ末端側の半分とカルボキシル末端側の半分の相同性にみられた違いがよく現れている。申請者らの研究室では、これらのことから主としてアミノ末端側の半分が制御機能に、カルボキシル末端側の半分が触媒機能に関与しているのではないかと推測してきた^{110, 111)}。

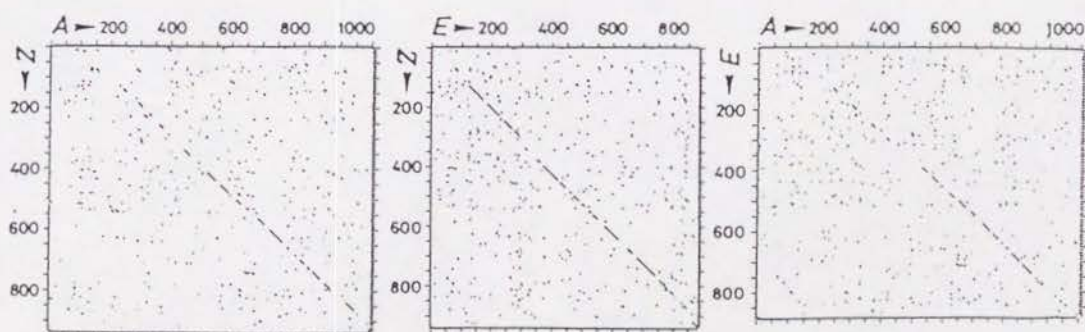


図9 大腸菌 (E)、トウモロコシ (Z)、ラン藻 (A) 酵素のマトリックス法による比較

PEPCの高次構造に関する情報を得るため、新たに開発した高度精製法によって調製した大腸菌酵素標品を用いて、大阪大学工学部の甲斐泰先生と共同でX線結晶解析を進行中である。すでに2種類の結晶が得られ、単位格子と空間群を決定している(参考論文2)¹¹⁴⁾(図10、11、表5)。

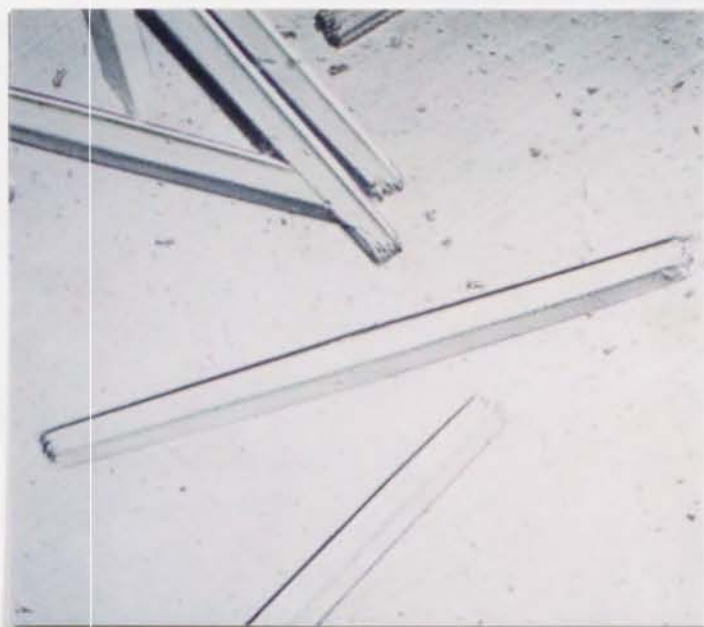


図 1.0 結晶 I

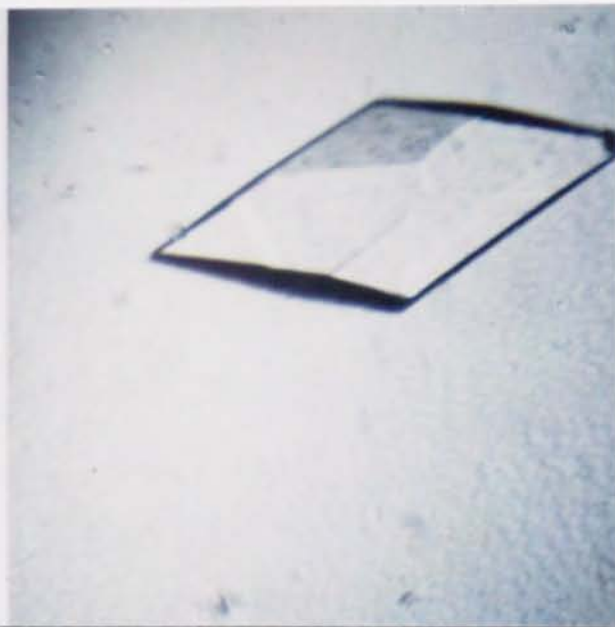


図 1.1 結晶 II

表 5 PEPCの結晶学的基本データ

	Crystal I	Crystal II
Crystal system	Hexagonal	Orthorhombic
Space group	$P6_222$ or $P6_422$	$I222$
Cell constant	$a = 131 \text{ \AA}$ $c = 325 \text{ \AA}$	$a = 119 \text{ \AA}$ $b = 252 \text{ \AA}$ $c = 83 \text{ \AA}$
Molecule		
per unit cell	4	2
per asymmetric unit	1/2	1/4
$V_m (\text{\AA}^3/\text{dalton})$	2.0	3.1

I - 5 本研究の背景と目的

PEPCの特異な触媒反応機構とアロステリック・エフェクターの生物種による多様性の分子的基礎を明らかにするには、高次構造を解明し触媒部位や制御部位に位置するアミノ酸残基を特定する分子論的解析が必要である。また、地球環境問題の一つとして最近、大気中の CO_2 濃度の増加が深刻な問題として議論されているが、この問題を解決する一つの有力な方法として、遺伝子操作によって改質した PEPCを植物に導入して炭酸固定能を増強したり、バイオリアクターとして利用する方法が考えられる。こうしたアプローチを試みるためには、PEPCの分子論的解析は必要不可欠である。PEPCの高次構造に関する情報が現時点では乏しいので、本研究では、部位

特異的変異法により種々の部位に変異を加えて機能の変化を探ることにより、機能部位を明らかにすることを目指した。材料としては酵素学的な知見が多く、蛋白質工学的に取扱いやすい大腸菌の酵素を用いることにした。

化学修飾や活性の pH プロファイルから PEPC の触媒能にヒスチジン残基の関与が示唆されている。大腸菌酵素ではヒスチジン残基が 13 カ所存在するが、いずれのヒスチジン残基が触媒機能に関与しているのか特定されていない。現在までに全一次構造の解明された 10 種類の PEPC のアミノ酸配列中で保存されたヒスチジン残基は大腸菌で 138 と 579 番目の 2 カ所だけであり (図 12)、いずれも PEPC にだけみられるユニークな配列中にある。そこで本研究では His138 をアスパラギン残基に置換した変異型酵素 (H138N) と His579 をアスパラギンもしくはプロリン残基に置換した変異型酵素 (H579N、H579P) を部位特異的変異法によって調製し、その酵素学的性質を調べた。なお PEPC に関して部位特異的変異法による研究は、申請者によるものが初めてである。

<i>E. coli</i> [96,97]	133 LVLTAHPTETIRR 145	574 ELTLFHGRGGSIGRGGAP 591
<i>C. glutamicum</i> ATCC13032 [102]	133 PVLTAHPTETRRR 145	607 KLRLFHGRGGTVGRGGGP 624
<i>C. glutamicum</i> AS019 [103]	133 PVLTAHPTETRRR 145	607 NVRLFHGRGGTVGRGGGP 624
<i>A. nidulans</i> [98,99]	241 LVFTAHPTEIVRH 253	727 KLRIFFHGRGGSVGRGGGP 744
<i>Z. mays</i> [100,101]	172 LVFTAHPQTSAAR 184	634 KLTLFHGRGGTVGRGGGP 651
<i>M. crystallinum</i> Ppc 1 [106,107]	176 LVFTAHPQTSVRR 188	629 KLTMFHGRGGTVGRGGGP 646
<i>M. crystallinum</i> Ppc 2 [108]	160 LVFTAHPQTSVRR 172	621 KLTMFHGRGGTVGRGGGP 638
<i>S. vulgare</i> C4-type [104]	159 LVFTAHPQTSAAR 171	621 KVTLFHGRGGTVGRGVGP 638
<i>S. vulgare</i> C3-type [105]	163 LVFTAHPQTSVRR 175	624 KLTMFHGRGGTVGRGGGP 641
<i>N. tabacum</i> [109]	167 LVLTAHPQTSVRR 179	628 KLTMFHGRGGTVGRGGGP 645

図 12 PEPC の 2 つの保存性ヒスチジン残基周辺のアミノ酸配列

1-6 本論文の内容

(1) His579 が触媒・制御機能において果たす役割

大腸菌 PEPC の His579 周辺のアミノ酸配列は、PEPC に特有で保存性が高く、PEP の結合に関与している可能性が考えられていた。そこでこのヒスチジン残基の役割を検討するために Eckstein 法による部位特異的変異を行い、アスパラギンとプロリンに置換した変異型酵素 (H579N、H579P) を得た。これら 2 つの変異型酵素を部分精製して、その速度論的性質を調べたところ、(1) アロステリック活性化因子である CoASAc 存在下で、野生型

酵素の見かけの最大速度を100%とするとH579Nは29%、H579Pは5.4%であった。②PEPの半飽和濃度は置換によって約40倍増加していたが、もう一つの基質(HCO_3^-)やコファクター(Mg^{2+})の半飽和濃度の増加は、それぞれ2倍と4倍にすぎなかった。③4種類のアロステリック活性化因子と人工的な活性化因子であるジオキサンの半飽和濃度は様々に変化していたが、なかでもCoASAcでは28倍と著しい増加がみられた。④アロステリック阻害因子であるアスパラギン酸の感受性には本質的な変化はみられなかった。

さらに、H579Nについては均一精製を行い、最大速度を正確に求めたところ、野生型酵素の69%であった。

以上の知見により、His579のイミダゾール基は触媒機構に不可欠ではないが、触媒・制御機構に重要な役割を果たしていると結論された。

(2) His138が触媒機構において果たす役割

もう一方の保存性ヒスチジン残基であるHis138の役割を検討するために、PCR (polymerase chain reaction) を用いた部位特異的変異法によりアスパラギンに置換した変異型酵素(H138N)を得て、その均一精製を行った。H138Nは活性を完全に喪失していたが、 HCO_3^- と Mg^{2+} に依存した基質PEPの脱リン酸化活性を有していた。この脱リン酸化活性の最大速度をCoASAc存在下で求めたところ、 $1.4 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ であった。H138Nの脱リン酸化活性は、野生型酵素の正規の反応(オキサロ酢酸の生成反応)の4種類のアロステリック活性化因子、ジオキサン、アロステリック阻害因子に対して感受性を示した。PEPCの段階的反応機構モデルによると一段階目の部分反応で2つの中間体、カルボキシリン酸とピルビン酸のエノール型アニオンが生成し、二段階目の部分反応であるカルボキシル基の転移反応が失われたことを意味する。したがって、His138は二段階目の部分反応に不可欠な残基であると結論された。

さらに、本教室の伊島理枝子氏、赤坂一之先生との共同研究として、大腸菌PEPCの $^1\text{H-NMR}$ による解析を試みており、現在まで得られた知見も加えて総合的に考察を行う。

第 II 章 材料と方法

II - 1 試薬類

PEPCの活性測定に用いた PEPは Clarkと Kirbyの方法¹¹⁵⁾に従って本研究室で合成され、シクロヘキシルアンモニウム塩としてデシケーター中、室温で保存されたものを用い、必要に応じてシクロヘキシルアンモニウムをイオン交換樹脂 (Dowex 50W-X8) によって除去し、カリウム塩に変えて使用した。PEPの定量は pyruvate kinaseと lactate dehydrogenaseを共役させた酵素的方法で行った。CoASAcは Simonと Sheminの方法¹¹⁶⁾に従って CoASHと無水酢酸から合成し Tubbsと Garlandの方法¹¹⁷⁾に従って定量した。CoASH、硫酸ストレプトマイシン、NADHは協和醗酵工業より、FBP、GTP、ジチオトレイトール、蛋白質定量用の標準蛋白質である結晶ウシ血清アルブミンは Sigma社より購入した。ジオキサンは同仁化学研究所(株)の核酸合成用を用いた。PEPCの活性測定や PEPの定量に用いたブタ心臓 malate dehydrogenase、ブタ心臓 lactate dehydrogenase、pyruvate kinaseは Boehringer Mannheim社より購入した。リン酸イオンの標準液は和光純薬工業社のイオンクロマトグラフ用を用いた。

酵素の精製に用いた DEAE-Toyopearl 650Sと Butyl-Toyopearl 650S、分子量の検定に用いた H P L C用 G4000SWカラムは東曹(株)社製のものを用い、Q-Sepharose FF anion exchanger、Superose 12 prep grade、Sephadex G-50 (DNA grade)は Pharmacia LKB Biotechnology社製のものを用いた。H P L Cシステムは日立製作所製 (L-6210型)のものを、F P L Cシステムは Pharmacia LKB Biotechnology社製のものを使用した。

M13 シークエンシングキット、7-DEAZA シークエンシングキット、キロシークエンスデレーションキットは宝酒造より、Sequenase ver. 2.0は US Biochemicals社より購入した。Oligonucleotide-directed *in vitro* mutagenesisキットと $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ は Amersham社から購入した。P C Rは Perkin Elmer Cetus社の Gene Amp kitと Atto社の Zymoreactor DNA増幅機を用いて行った。制限酵素と DNA修飾酵素は宝酒造、ニッポンジーン、東洋紡、New England Biolab社から購入した。

Eckstein法による部位特異的変異の際に用いた合成オリゴヌクレオチド

のうち、15ヌクレオチドのものは安部商事に、32ヌクレオチドのものは住友化学工業(株)宝塚総合研究所の藪崎義康博士に合成して頂いた。PCRを用いた部位特異的変異に用いた4本の合成オリゴヌクレオチドは Applied Biosystems社の 381A型 DNA合成機で合成した後、同社の OPCTM 精製用カートリッジを用いて精製した。

電気泳動用アガロースは分析用には同仁化学研究所の type 2を、1 kb以上の DNAの回収用には Bethesda Research Laboratories社の低融点アガロースを、1 kb以下の DNAの回収にはポリアクリルアミドゲルまたは FMC社の NuSieveアガロースと SeaKemアガロースを 3:1の割合で混合して用い、Bio 101社の Gene clean kitで精製した。

ウェスタン・ブロッティングの際に用いたメンブレンは Millipore社の Durapore 0.22 GVHP フィルターを用い、メンブレンのブロッキング用のゼラチン (EIAグレード) は Bio-Rad社 より購入した。*E. coli* の PEPC に対するウサギ抗体は村田卓也氏が本研究室で調製したものを、二次抗体として Peroxidase標識抗ウサギ IgGヤギ抗体 (Bethesda Research Laboratories社) を用いた。

その他の試薬は半井化学薬品工業もしくは和光純薬工業より購入した。

II-2 大腸菌の菌株とプラスミド

本研究で用いた大腸菌 K-12株を表6にまとめた。このうち PEPCの遺伝子 *ppc*の欠失株である F15株は、MN42 λ -株¹¹⁸⁾を *recA*欠損株にしたもので、Glansdorff博士 (Vrije Universiteit Brussel, Belgium) より

表6 本研究で用いた大腸菌 (*Escherichia coli*) の菌株

Strains	Genotype	References
PCR1	F ⁻ , <i>ppc2</i> , <i>recA1</i> , <i>arg</i> , <i>leu</i> , <i>thr</i> , <i>thi</i> , <i>rpsL</i>	96
F15	Hfr, <i>recA1</i> , <i>met</i> , Δ (<i>ppc-argECBH</i>), Tn10(<i>tet^r</i>)	personal communication
DH1	F ⁻ , λ ⁻ , <i>thi-1</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>supE44</i> , <i>hsdR17</i> (<i>r_K⁻</i> , <i>m_K⁺</i>)	119
JM101	<i>supE</i> , <i>thi</i> , Δ (<i>lac-proAB</i>), F[<i>traD36</i> , <i>proAB</i> , <i>lacI^qZAM15</i>]	120
JM109	<i>supE44</i> , <i>thi</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , Δ (<i>lac-proAB</i>), F[<i>traD36</i> , <i>proAB</i> , <i>lacI^qZAM15</i>]	121
TG1	<i>supE</i> , <i>thi</i> , Δ (<i>lac-proAB</i>), <i>hsdΔ5</i> , F[<i>traD36</i> , <i>proAB</i> , <i>lacI^qZAM15</i>]	14

供与して頂いた。F15株のもつ、これら2つの遺伝子型はPEPCの変異型酵素を発現させて、PEPCの構造-機能相関を研究する上で望ましい¹²²⁾。本研究で使用した大腸菌PEPCの遺伝子をもつプラスミドはpS2である⁹⁸⁾。変異を導入したプラスミドpSH138N、pSH579N、pSH579Pは、本研究で構築した。M13ファージはMessingらによって一本鎖DNA(ssDNA)調製用クローニング・ベクターとして開発されたM13mp系ベクター^{120, 121)}のうちM13mp18、mp19の複製型をPharmacia社から購入して用いた。

II-3 大腸菌の培養

大腸菌の培養に用いた液体培地の組成は表7に示す通りである。富栄養培地としては、通常LB培地を用いた。栄養要求性についての選択培地は最少培地であるE培地¹²³⁾に、安楽の金属塩溶液¹²⁴⁾、グルコース、要求アミノ酸、抗生物質を加えたものを用いた。

変異型酵素の調製を目的とした大量培養は3段階に分けて行った。まず、前培養として、5 mlのLB培地(50 μ g/mlのアンプシリンを含む)に大腸

表7 大腸菌の培養に用いた培地

LB medium (per liter)		50xE-medium	Anraku's metal solution (per liter)
Yeast extract	5 g	To 670 ml of H ₂ O, add:	FeCl ₃ ·6H ₂ O 480 mg
Polypeptone	10 g	MgSO ₄ ·7H ₂ O 10 g	MnCl ₂ ·4H ₂ O 280 mg
NaCl	5 g	Citric acid·H ₂ O 100 g	CaCl ₂ 270 mg
D-glucose	1 g	K ₂ HPO ₄ 500 g	ZnCl ₂ 2000 mg
Adjust the pH to 7.2 with 1N NaOH.		NaNH ₄ HPO ₄ ·4H ₂ O 175 g	H ₃ BO ₃ 290 mg
		After dilution, adjust the pH to 7.2 with 1 N NaOH.	CoSO ₄ 130 mg
Glu ⁻ medium for PCR1 (per liter)		Glu ⁻ medium for F15 (per liter)	
To 945 ml of sterile deionized H ₂ O, add:		To 917 ml of sterile deionized H ₂ O, add:	
50xE-medium	20 ml	50xE-medium	20 ml
1 % L-leucine	10 ml	1 % L-methionine	10 ml
5 % L-threonine	2 ml	10 % L-arginine·HCl	2 ml
10 % L-arginine·HCl	1 ml	Anraku's metal solution	1 ml
0.3 % thiamine·HCl	1 ml	20 % D-glucose	50 ml
Anraku's metal solution	1 ml		
20 % D-glucose	20 ml		

菌のPCR1もしくはF15の変異型プラスミド保持菌を接種し、37℃で一晩、振盪培養した。二次培養としてPCR1用もしくはF15用の最少培地200 mlに、前培養した菌体の懸濁液2 mlを接種した。一晩振盪培養した後、本培養として1.3 lの最少培地を入れた容量5 lの三角フラスコを8本用意し、二次培養した菌体の懸濁液を各13 ml接種し、30℃で振盪培養した。菌体の成長については、内径18 mmの試験管に培養液の一部を取り、660 nmの吸光度を測定することにより追跡した。

PCR1のプラスミド保持菌の培養の際、最少培地中に加えたグルコースは0.4%であるが、PEPCの発現量が少なかったF15のプラスミド保持菌の時には発現量を増すために1%にした。大腸菌W株を用いた実験によると、炭素源として加えたグルコース濃度に比例してPEPCの生合成レベルも上昇することが知られている¹²⁵⁾。活性のない変異型酵素を発現させる際には、1 g/lのグルタミン酸ナトリウムを最少培地に加えた。

II-4 基本的な遺伝子操作

DNAの制限酵素による切断、連結反応、フェノール抽出、エタノール沈澱によるDNAの回収、2-ブタノールによるDNAの濃縮、アガロースゲルまたはポリアクリルアミドゲルによる電気泳動、ゲルからのDNAの回収、DNAの定量等の基本的な遺伝子操作は文献126に従って行った。大腸菌の形質転換は主として文献127に従った。

塩基配列の確認はジデオキシ法によっておこなった¹²⁸⁾。実際にはM13シーケンシングキットまたは7-DEAZAシーケンシングキット等のキットを用いて行っており添付の説明書に従って行った。

7-DEAZAシーケンシングキットは、dGTPの代わりに2'-デオキシ-7-デアザグアノシン三リン酸を用いてシーケンス反応を行う方法であり、グアニンやシトシンの多い配列でもゲル電気泳動時におけるバンドの解像力が優れている。ジデオキシ法における鋳型一本鎖DNAは、M13mp18またはM13mp19のマルチクローニング部位に、シーケンシングを行う領域を組み込んで調製した。

II-5 Eckstein法による His579の置換

(1) 合成オリゴヌクレオチドの調製

大腸菌の PEPCの His579を部位特異的変異により置換する際、プライマーとして用いた2種類の合成オリゴヌクレオチド (HN579と HP579) の構造を図13に示す。プライマー HN579は 15ヌクレオチドからなり His579を Asnに置換する時に用いた。HP579は 32ヌクレオチドからなり Proに置換する際用いた。His579近傍の塩基配列に対し、HN579は1つのミスマッチをもち、HP579は3つのミスマッチをもつ。HP579の Leu575と Gly580のミスマッチ2つによって導入される変異は、野生型と同一のアミノ酸残基をコードしており、制限酵素 SacIと SmaIの認識部位をそれぞれ新たに生じる。こうして、2つの制限酵素認識部位の間の塩基配列を、適当な合成オリゴヌクレオチドと入れ換えるだけで His579を他のアミノ酸残基のコドンに容易に変換することができる。

これらのプライマーは、固相合成法による自動 DNA合成機により合成され、オリゴヌクレオチドの 5'-末端にはジメトキシトリチル基がついており、塩基部分のアミノ基にはベンゾイル基やイソブチリル基が保護基としてついていた。以下、合成オリゴヌクレオチドの精製過程を簡単に述べる。

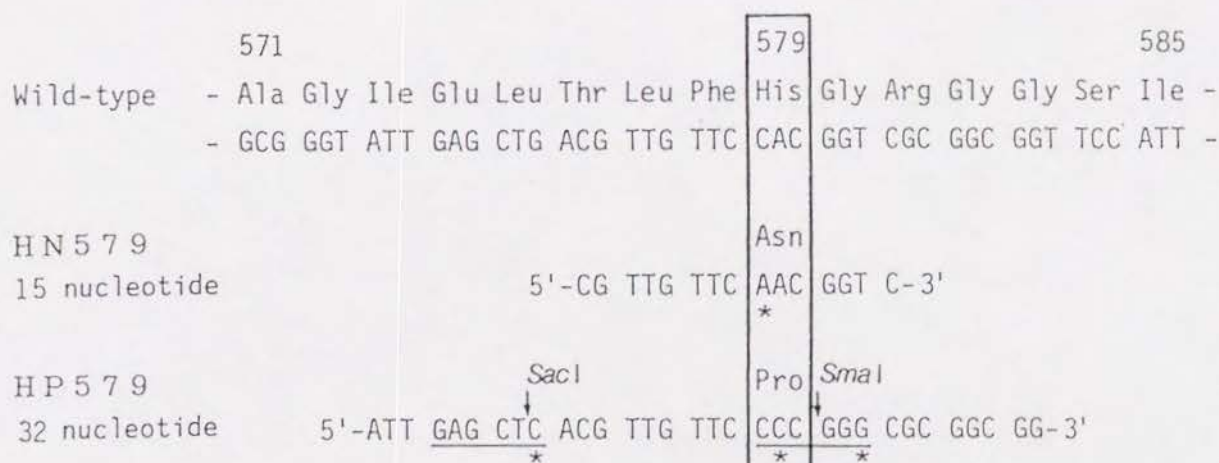


図13 His579近傍と部位特異的変異に用いたプライマーの構造

野生型とミスマッチする塩基は★で示す。下線は HP579によって導入される SacIと SmaIの認識部位であり、それらの切断部位を↓で示した。

合成オリゴヌクレオチドのアンモニア溶液 1.5 mlに、2 mlの28%アンモニア溶液を加え、55℃の水浴中で5時間加熱して塩基部分のアミノ基を脱保護し、室温でアンモニアを留去、減圧濃縮した。その後、Waters社の μ -Bondapak C₁₈ (φ8×250mm) カラムを用いてHPLCで精製した。0.1 M トリエチルアンモニウムアセテート (pH 7.0) を含むアセトニトリル溶液でアセトニトリル濃度を5%から40%に直線的に増加させて、ジメトキシトリチル体のオリゴヌクレオチドを分取した。この試料を、減圧下で濃縮乾固した後、80%酢酸を加え室温で20分間反応させてジメトキシトリチル基の脱保護を行った。反応後、直ちに減圧下で濃縮乾固して酢酸を除き、水に溶かしてから酢酸エチルで2回抽出し、水層を減圧濃縮した。この試料をHPLCで精製して、全ての保護基の除かれた高純度の合成オリゴヌクレオチドが得られた。精製した合成オリゴヌクレオチドは、5'-末端が-OHなので T4 polynucleotide kinase を用いてリン酸化した。

(2) 部位特異的変異の導入

本研究では変異導入の際 Amersham社の Oligonucleotide-directed *in vitro* mutagenesis systemキットを用いた。このキットは原報¹²⁾に比べると、チオールヌクレオチドの入った二本鎖DNAを合成後、未反応の鋳型一本鎖DNAをニトロセルロースメンブレンで除いて、95%以上の変異効率を達成している。

部位特異的変異の導入は、次の7つの段階からなる。

- ① 鋳型一本鎖DNAの調製 ② 鋳型一本鎖DNAと変異導入用プライマーのアニーリング ③ 二本鎖DNAの合成 ④ 未反応の鋳型一本鎖DNAの分離
- ⑤ ニックの形成 ⑥ exonuclease III による(+)鎖の分解 ⑦ 二本鎖DNAの再合成 (図2参照)。

以下の操作を図14に模式的に表す。

鋳型一本鎖DNA用のベクターには、M13mp18ファージを用いた。一般に、M13ファージのマルチクローニング部位に挿入できる外来DNAは、1 kb程度であるので、大腸菌 PEPC の翻訳領域 (2643 bp) を全て組み込むことはできない。そこで His579付近の翻訳領域 444 bpを制限酵素 SspIと SnaBIで

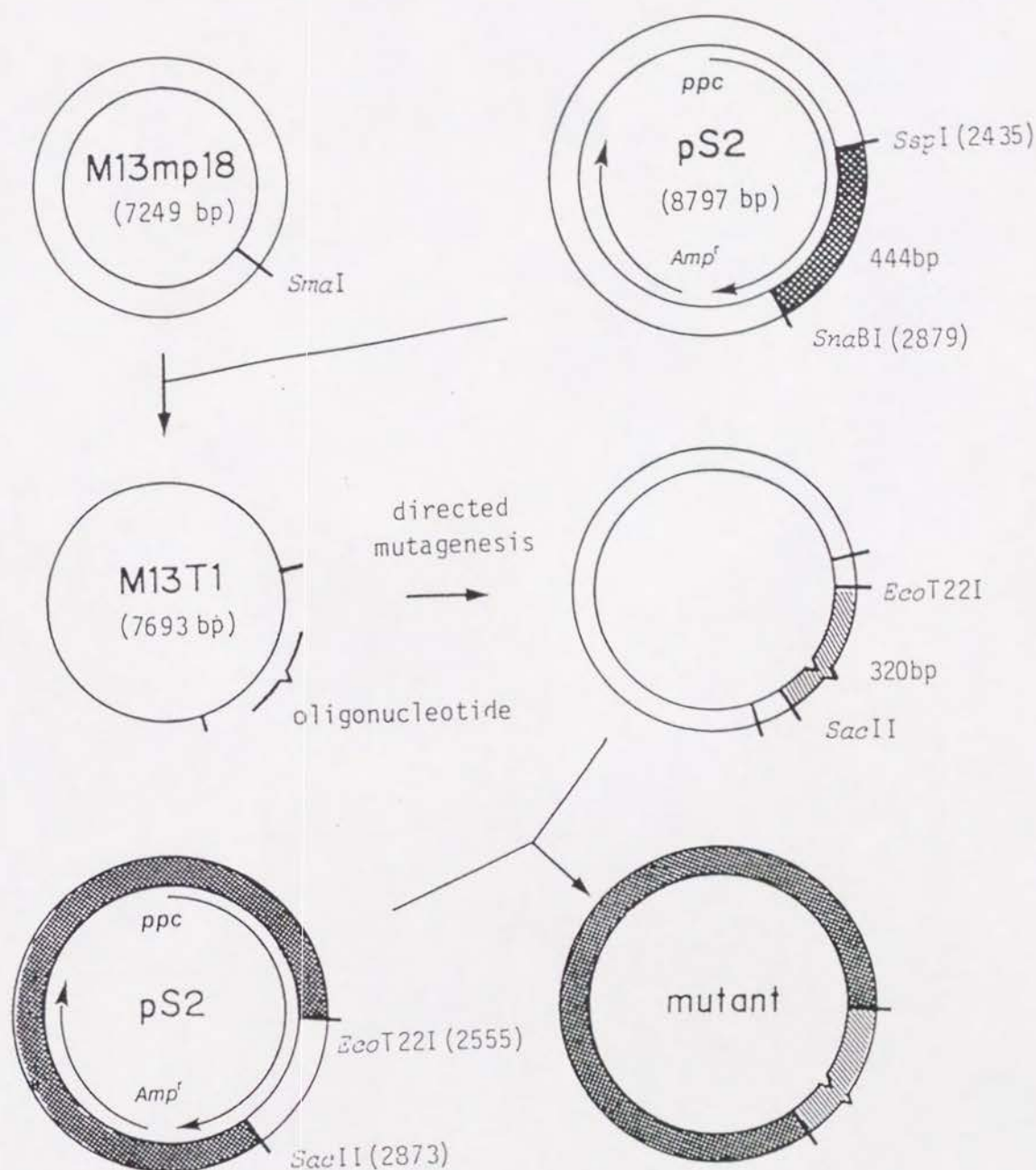


図14 His579を置換した変異型プラスミドの構築

変異型プラスミド調製の際に pS2で利用した制限酵素部位の番号は、大腸菌 PEPC遺伝子 (*ppc*) の 5'-末端にある *SalI*部位を 1 とした時の位置を示す。斜線で影をつけた部分は、変異を導入した複製型ファージ DNAに由来する領域である。

切り出し、M13mp18のマルチクローニング部位の SmaI 部位に組み込んだ。このとき用いた制限酵素は平滑末端を生じるため、一本鎖DNAを調製したとき PEPC の塩基配列部分がアンチセンス鎖かセンス鎖側の2種類が得られる。そこで単一プラークから常法に従って ssDNAを調製し、挿入したDNAの塩基配列を確認してどちらかを決定した。変異導入用のプライマーはセンス鎖側の ppc の塩基配列の一部をもつので、アンチセンス鎖側の塩基配列をもつものを鋳型一本鎖DNA M13T1とした。M13T1は文献 14の方法に従って、大腸菌 TG1を宿主として大量に調製し、以下の実験に用いた。

ただしプライマーとして HP579を用いたときは、プライマー内に NciI 認識部位が存在するため、合成された(-)鎖も切断を受ける。そのため NciI の代わりに PvuIIを用いてニックを形成した。

(3) 変異株の確認

変異導入反応で得られた反応液を用いて大腸菌 TG1 株の形質転換を行い ssDNAと dsDNAを調製した。2種類のプライマーのうち、HP579は2つの新たな制限酵素認識部位を導入するので、ジデオキシ法による塩基配列の確認を行う前に18個の独立なクローンを制限酵素で消化してアガロース電気泳動で解析した。このうち13個がこれら2つの制限酵素によって切断を受けたことから、HP579を用いたときの変異効率は76%と計算できる。その後塩基配列の確認を行って、導入した変異以外の変異が存在しないことを確認した。一方プライマーとして HN579を用いたときは、5個の独立なクローンの塩基配列を確認したところ、4個のクローンに予定した変異が正しく導入されていた。

(4) 変異 DNA断片のものとプラスミドへの導入

正しく変異の導入されたクローンの dsDNAから SacIIと EcoT22Iで完全消化した後、ポリアクリルアミドゲル電気泳動により変異領域を含む 320 bpの DNA断片を回収した。

続いてプラスミド pS2から 320 bpの相当領域を除いたDNA断片を調製した。pS2は EcoT22I認識部位を2カ所もつため、はじめに EcoT22Iによる部

分消化を行って、低融点アガロースゲル電気泳動により1カ所でのみ切断されたDNA断片を分離し抽出した。その後、この直鎖状DNAを *Sac*IIで完全消化し、bacterial alkaline phosphataseによって脱リン酸化し、さきに得た320 bpのDNA断片と連結反応をおこない、DH1株に形質転換した。

形質転換したDH1株から複数の独立なプラスミドを得て、それらの制限酵素切断パターンから、正しく320 bpのDNA断片が挿入されたプラスミドを選択した。これらのクローンの塩基配列をM13T1を調製したときと同様に、M13ファージにサブクローニングして、*Sna*BI-*Ssp*I断片(444 bp)の確認を両方向について行い(図15)、変異型PEPCをコードするプラスミドpSH579N、pSH579Pとして以後の実験に用いた。

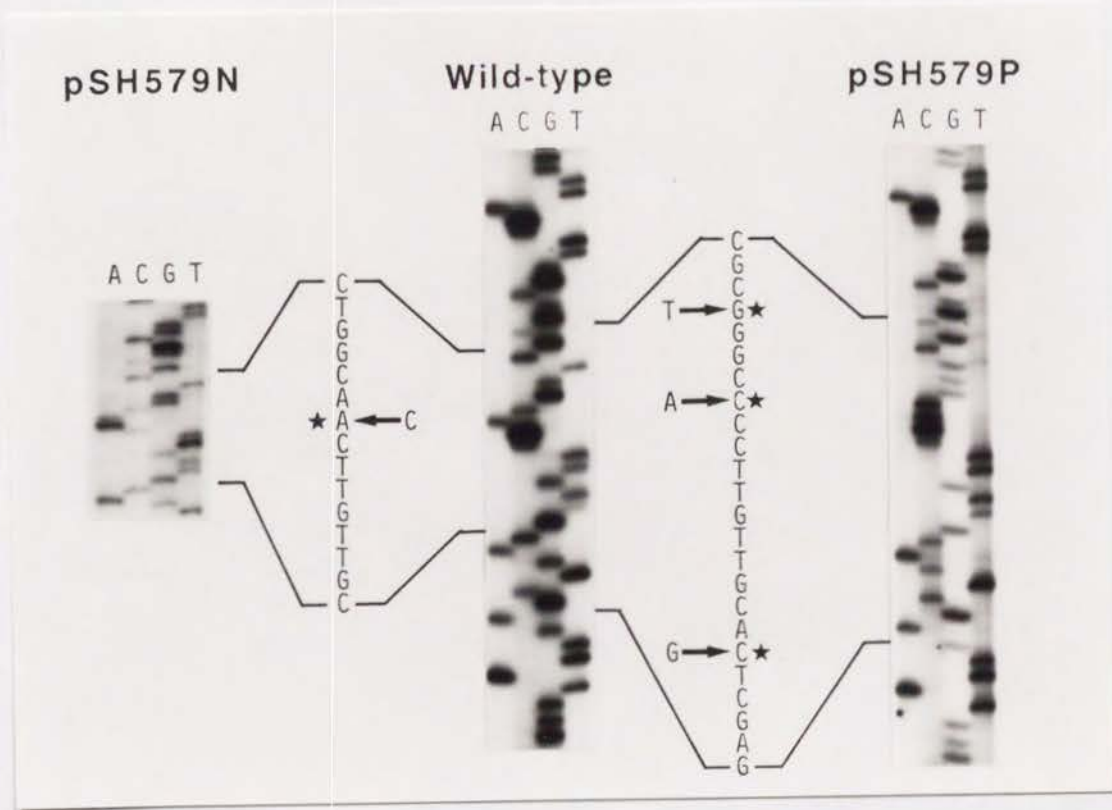


図15 pSH579NとpSH579Pの塩基配列の確認

図は変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動後の、His579コドン周辺のオートラジオグラムを示す。
★は変異を導入した塩基を示す。

II-6 PCR法による His138の置換

His138を Asnに置換する際、PCRを用いた Overlap extension法¹⁶⁾によって行った。PCRによる部位特異的変異を行った領域を模式的に表したのが図16Aである。図16Bは部位特異的変異の導入用のプライマーの構造を示している。1回目のPCRはプライマーaとb、プライマーcとdの2つの組合せで別々に行い、DNA断片ABとCDを得た。この2つのDNA断片は、必ずプライマーを取り込んでいるので野生型の塩基配列は含まない。つづいてこの2つのDNA断片を鋳型に、プライマーaとdを用いてPCRによる融合増幅反応を行い、DNA断片ADを得た。

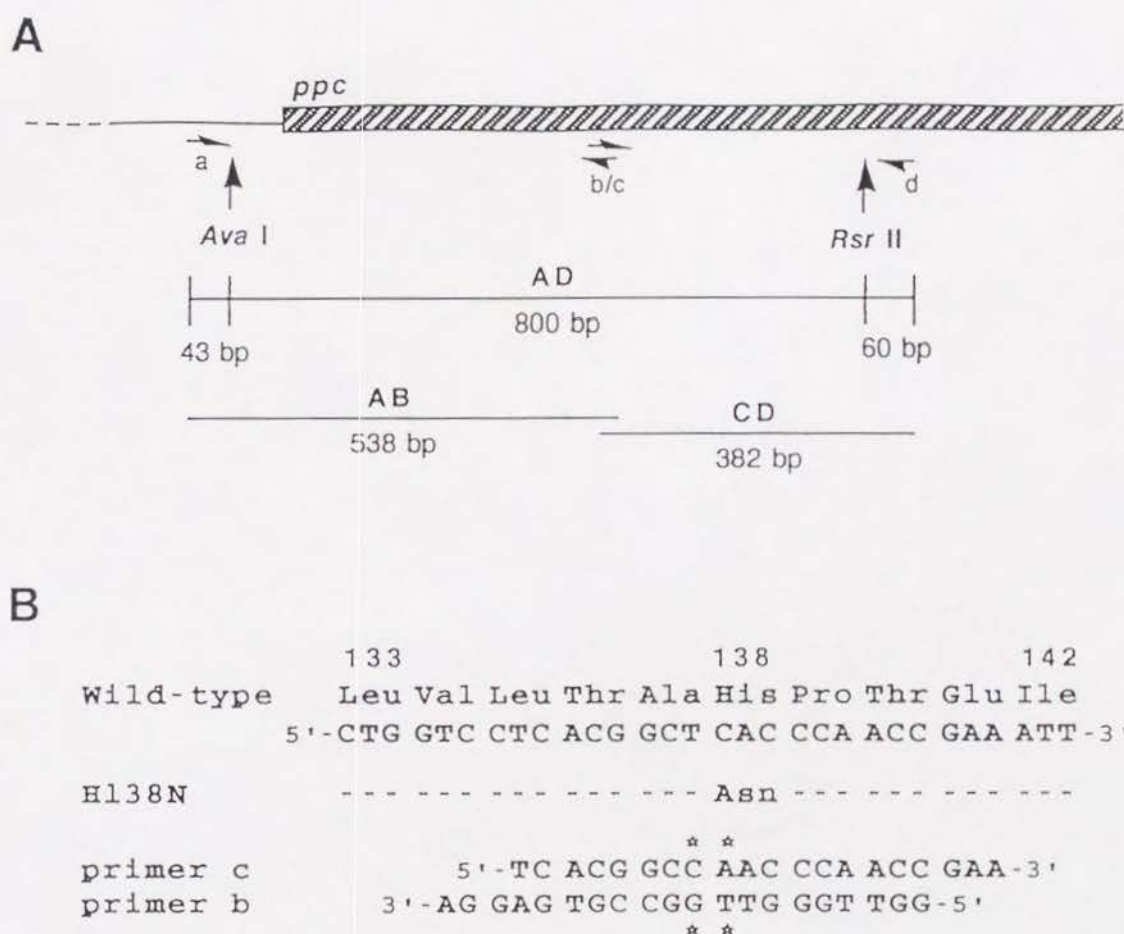


図16 His138のPCRによる部位特異的変異の模式図

(A) 大腸菌 PEPC遺伝子 (ppc) に対するプライマー (a,b,c,d) の位置とPCRによって生成したDNA断片 (AB,CD,AD) の長さを示す。(B) 変異を導入するために用いた中央のプライマー (b,c) の配列を示す。融合DNA断片ADは AvaIと RsrIIで消化して、ppcを担うプラスミド pS2の相当部位と置換した。

P C Rによる増幅反応は 0.1 μ gの鋳型 DNA (pS2)、50 mM KCl、10 mM Tris-HCl (pH 8.3)、1.5 mM $MgCl_2$ 、0.01%(w/v) gelatin、0.2 mM 各dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)、2.5 unitsの *Tag* polymerase、1 μ M 各プライマーの反応溶液 0.1 ml中で行った。反応溶液の蒸発による濃縮を避けるために 0.1 mlのミネラルオイル (Sigma社、M-3516) を重層し、変性 (1 分間、94 $^{\circ}$ C) \rightarrow アニール (2 分間、50 $^{\circ}$ C) \rightarrow 伸長 (3 分間、72 $^{\circ}$ C) 反応サイクルを30回 DNA増幅機で行った。反応生成物は、3% NuSieve アガロースと1% SeaKemアガロースを混合したアガロースゲルを用いて電気泳動し、Gene Clean kitによって精製した。

変異を導入した DNA断片ADは制限酵素 *RsrII*と *AvaI*によって完全消化し、プラスミド pS2の相当領域と置換した。得られたクローンから独立なプラスミドを調製し、それらの制限酵素切断パターンから正しく 800 bpのDNA断片が挿入されたプラスミドを選択した。これらのクローンからP C Rで合成した領域を含む約 1 kbの塩基配列を M13にサブクローンして、塩基配列の確認を両方向について行った (図17)。このとき、鋳型 DNAはキロシーケンス用デリーションキットを用いて調製した。こうして得た変異型 PEPCをコードするプラスミドを pSH138Nとして、以後の実験に用いた。

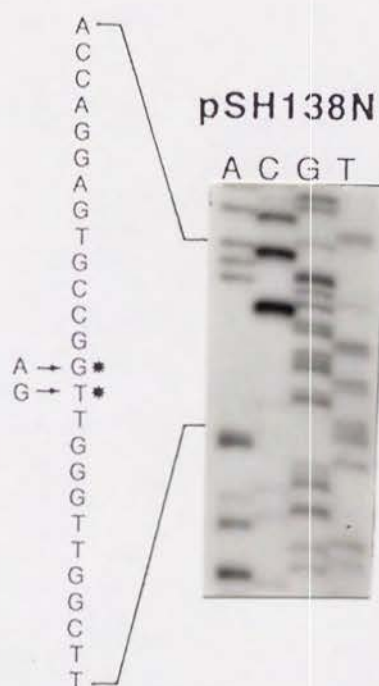


図17 pSH138Nの塩基配列の確認

図は変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動後の、His138コドン周辺のオートラジオグラムを示す。★は変異を導入した塩基を示す。

II-7 蛋白質の定量および分光学的方法による酵素活性の測定

蛋白質の定量は Bradford法¹²⁹⁾を原理とする Bio-Rad社の蛋白質定量用キットを用い、標準蛋白質としては結晶ウシ血清アルブミンを用いた。

PEPCの活性は、malate dehydrogenaseとの共役反応系を用いて、分光学的に測定した¹³⁰⁾。活性測定用標準反応混液（全容 1.0 mlもしくは 0.1 ml）は 5 mM PEP（カリウム塩）、10 mM KHCO_3 、10 mM 酢酸マグネシウム、0.1 mM NADH、0.1 M Tris-酢酸（pH 8.5）、1.5 IU malate dehydrogenaseと酵素溶液を含む。本酵素は、アクチベーター非存在下では極めて低い活性しか示さないのので、必要に応じて反応混液には非生理的活性化因子であるジオキサンを加えた。酵素溶液を除く反応混液を 30 °Cでブレインキュベーションした後、酵素溶液を添加して反応を開始させ、NADHの酸化に伴う 340 nmの吸光度の減少速度を測定した。NADHの 340 nmにおける吸光係数は $\epsilon_{340} = 6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ とした。このとき 1 分間に $1 \mu\text{mol}$ の NADHを酸化する活性を 1 単位とし、蛋白質 1 mg当りの活性を比活性と定義した。PEPの脱リン酸化活性を測定する際には、上記の標準反応混液中の malate dehydrogenaseの代わりに 7.5 IU lactate dehydrogenaseを共役酵素として用い、PEPの脱リン酸化の結果生じるピルビン酸の生成速度を同様に測定した。

II-8 リン酸遊離活性のリンモリブデン酸法による測定

PEPを基質としたリン酸遊離活性の測定は、遊離した無機リン酸をリンモリブデン酸法^{131), 132)}によって定量して行った。酵素反応のための反応混液（全容 4 ml）は 5 mM PEP（カリウム塩）、10 mM KHCO_3 、10 mM 酢酸マグネシウム、0.1 M Tris-酢酸（pH 8.5）、1.17 M ジオキササンと酵素溶液を含む。酵素溶液を除く反応混液を 30 °Cで、2 分間ブレインキュベーションした後、酵素溶液の添加によって反応を開始した。経時的に反応液の一部（0.5 ml）を取り出し、70 % 過塩素酸 0.25 mlを加えて反応を停止した。さらに 40.5 mM モリブデン酸アンモニウム 1 mlおよび酢酸ブチル 2.5 mlを加えてよく混合し、室温で 5 分間放置し、再びよく混合してから低速遠心分離を行い酢酸ブチル中に抽出されたリンモリブデン酸を回収し、

310 nmにおける吸光度を測定した。結果は単位時間における反応液 1 mlあたりの無機リン酸の遊離量 (mol/ml) として表示した。標準試料としてはリン酸イオン標準液 (0.25–5 μ g リン原子) を用いた。

II-9 HCO_3^- を含まない試薬類の調製

酵素反応の HCO_3^- の依存性を調べる実験では、外部からの炭酸ガスの混入を防ぐために、以下のようにして調製した試薬類を用いた。Tris- H_2SO_4 緩衝液の調製には、まず必要量の 75% 量の Tris 塩基を水に溶解し、あらかじめ算出しておいた量の 3 M H_2SO_4 を加えて約 pH 2 とした。ソーダライムのカラムを通して精製した窒素ガスを約 20 分間通気した後、Tris 塩基の残量を一度に加えて目的とする pH とした。酵素溶液は使用直前に、上記のようにして調製した緩衝液で平衡化した Sephadex G-50 のカラムを用い、スパンカラム法によってゲル濾過したものを用いた。これらとは別に、蒸留水に終濃度が 0.1 mM となるように硫酸を加え (約 pH 4) て 20 分間煮沸させたのち、KOH 管をつけて冷却したものを用意して、その他の固体試薬の溶解、および緩衝液の希釈に使用した。使用に際して pH の再調製は特に必要なかった。酵素反応は、気相を窒素置換したセル中で行った。

II-10 PEPC の精製

操作はすべて 0–4 $^{\circ}\text{C}$ において行った。

(1) 野生型酵素の精製

大腸菌 PCR1/pS2 からの野生型酵素の精製は申請者らの開発した Butyl-Toyopearl カラムクロマトグラフィーによる方法^{11,4)}で行った。この方法は従来、申請者らの研究室で PEPC の精製最終段階において行われていた hexyl-Sepharose カラムクロマトグラフィー^{133, 134)}を置き換えたものである。Butyl-Toyopearl カラムクロマトグラフィーではアスパラギン酸の添加による特異的な溶出法により、比活性約 120 units/mg の均一酵素標品を 70% 程度の収率で得ることができた。

(2) 変異型酵素の精製

変異型酵素 PEPCの調製は、菌体（約 15 g湿重量）をほぼ等容量の緩衝液 A（0.1 M Tris- H_2SO_4 (pH 7.4)、20%(v/v) グリセロール、20 mM アスパラギン酸ナトリウム、1 mM フェニルメチルスルホニルフルオリド、1 mM ジチオトレイトール）に懸濁し、フレンチプレス（大岳製作所製 5501型）で 1000-1400 kg/cm² に加圧した懸濁液を大気圧下に放出することにより、菌体を破碎した。つづいて遠心分離して上清をとり、沈澱は少量の緩衝液 A に再び懸濁して遠心分離し、その上清を先の上清とあわせて粗酵素液とした。その後、ストレプトマイシン処理による除核酸、硫酸アンモニウム分画（38-55%飽和 硫酸アンモニウム）を行った。活性の検出されなかった変異型酵素は、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動もしくは必要に応じて野生型酵素に対するウサギ抗体を用いたウェスタン・ブロッティングによって検出した。

H 5 7 9 N と H 5 7 9 P の部分精製標品は DEAE-Toyopearl イオン交換クロマトグラフィーを一度行って調製した。H 1 3 8 N と H 5 7 9 N の均一精製は、まず Q-Sepharose イオン交換クロマトグラフィーを行い硫酸アンモニウム濃度勾配による Butyl-Toyopearl 疎水性カラムクロマトグラフィーを行った。H 5 7 9 N については、さらに Superose 12 ゲル濾過クロマトグラフィーによって均一精製を達成した。

H 5 7 9 N と H 5 7 9 P の部分精製は、まず硫酸アンモニウム分画によって得られた沈澱を少量の緩衝液 B（50 mM Tris-HCl (pH 7.4)、10 mM アスパラギン酸ナトリウム、1 mM ジチオトレイトール）に溶解し、80-100 倍容の緩衝液 B に対して一晩透析した。透析後、分画液を緩衝液 B で平衡化した DEAE-Toyopearl イオン交換カラム（ ϕ 1.6×10 cm）に加えた。流速は 10 ml/hr·cm² とし、ベッド容量の約 6 倍容量の緩衝液 B でカラムの洗浄を行った。PEPC の分離溶出は、緩衝液 B を流しながら、0 M から 0.5 M まで NaCl の直線濃度勾配をかけて行った。カラムは、この後、1 M NaCl を含む緩衝液 B で洗浄した。PEPC を含む画分は、硫酸アンモニウムを加えて 60% 飽和溶液とし沈澱を集めた。得られた沈澱は少量の保存溶液（60% 飽和硫酸アンモニウム、0.1 M Tris- H_2SO_4 (pH 7.4)、10 mM

アスパラギン酸ナトリウム)に懸濁して4℃で保存した。

H 1 3 8 NとH 5 7 9 Nの均一精製の場合は、硫酸アンモニウム分画の沈澱を少量の5%(v/v)グリセロールを含む緩衝液Bに溶解し、一晚透析した可溶性蛋白質を、同じ緩衝液で平衡化したQ-Sepharoseカラム(φ 1.6 x 60 cm)に加え、DEAE-Toyopearlクロマトグラフィーの時と同様に0 Mから0.5 MまでのNaCl直線濃度勾配によって溶出した。ただしこのときの流速は50 ml/hr・cm²で行った。PEPCを含む画分を60%飽和硫酸アンモニウムとし、遠心分離で沈澱を集めた。この沈澱を緩衝溶液C(50 mM Tris-H₂SO₄ (pH 7.4)、0.8 M 硫酸アンモニウム、5%(v/v)グリセロール、10 mM アスパラギン酸ナトリウム、1 mM ジチオトレイトール)に溶かして、緩衝溶液Cで平衡化したButyl-Toyopearlカラム(φ 2.6x21 cm)に加えた。PEPCの溶出は0.8 Mから0 Mまでの硫酸アンモニウムの直線濃度勾配により行った。PEPCを含む画分は、硫酸アンモニウム沈澱として回収し、保存溶液に懸濁して保存した。H 5 7 9 Nはさらに緩衝溶液D(0.1 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4)、5%(v/v)グリセロール、10 mM アスパラギン酸ナトリウム、1 mM ジチオトレイトール)に溶かし、緩衝液Dで平衡化したSuperose 12カラム(φ 1.6x50 cm)に加えて、FPLCシステムを用いたゲル濾過を行った。

野生型酵素も変異型酵素も、保存溶液中で少なくとも3カ月間、活性を失わなかった。保存した酵素を実験に用いる場合には、以下の処理を行った。酵素の懸濁液を少量の50 mM Tris-H₂SO₄ (pH 7.4)に溶解し、最終濃度が1 mMになるようにジチオトレイトールを加え、0℃で1時間放置した。その後、50 mM Tris-H₂SO₄ (pH 7.4)で平衡化したSephadex G-50を用いたスパン・カラム法¹²⁶⁾によって脱塩した。

II-12 ウェスタン・ブロッティング

ウェスタン・ブロッティングは村田卓也氏の方法⁶⁵⁾に従って行った。一次抗体は大腸菌PEPCに対するウサギ血清を、二次抗体はperoxidase標識抗ウサギIgGやギ血清を用いた。ブロッティングにはgelatinを用いた。

第 III 章 結 果

III - 1 変異型酵素の発現

His579を Asnもしくは Proに置換した2種類の変異型酵素 (H 5 7 9 N、H 5 7 9 P) および His138を Asnに置換した変異型酵素 (H 1 3 8 N) を得るためにプラスミド pSH579Nと pSH579P、pSH138Nを用いて、大腸菌の *ppc* 欠損変異株 PCR1と *ppc* 欠失株 F15を形質転換した。これら2つの宿主は PEPCを欠いており、Krebsサイクルに C_4 -ジカルボン酸であるオキサロ酢酸を供給できないために、発育にグルタミン酸を要求する。したがって、変異型酵素がこれら2つの宿主の発育を支えるだけの活性を有するか否かを調べるために、グルタミン酸を含まない最少培地における形質転換体の成長の有無を検討した。

まず、His579を置換した2つの変異型酵素について調べたところ、いずれの場合もグルタミン酸に対する宿主菌の栄養要求性を相補することが確認された。そこで PCR1株の形質転換菌から粗酵素液を調製し、それぞれの変異型酵素の比活性を求めた (表8)。このときの比活性は野生型酵素の形質転換菌 (PCR1/pS2) に対して、H 5 7 9 Nが約 1/7、H 5 7 9 Pが約 1/130であった。変異型酵素にみられた比活性の低下の一因として、大腸菌内での発現量の低下が考えられる。そこで変異型酵素の硫酸アンモニウム分画 (38 - 55% 飽和) 後の標品を用いてウェスタン・ブロッティングを行った (図18)。その結果変異型酵素も野生型酵素もともに同じ位置にはほぼ同じ濃さのバンドが観察され、発現量に大きな差は認められな

表8 大腸菌 PCR1株形質転換体の粗酵素液の比活性

活性測定は標準反応混液の PEPを 2 mMに変更し、1.17 Mシオキサンをアクチベーターとして加えた。

Transformants	Activity (units·mg ⁻¹ protein)
PCR1/pS2	10.9
PCR1/pSH579N	1.51
PCR1/pSH579P	0.085

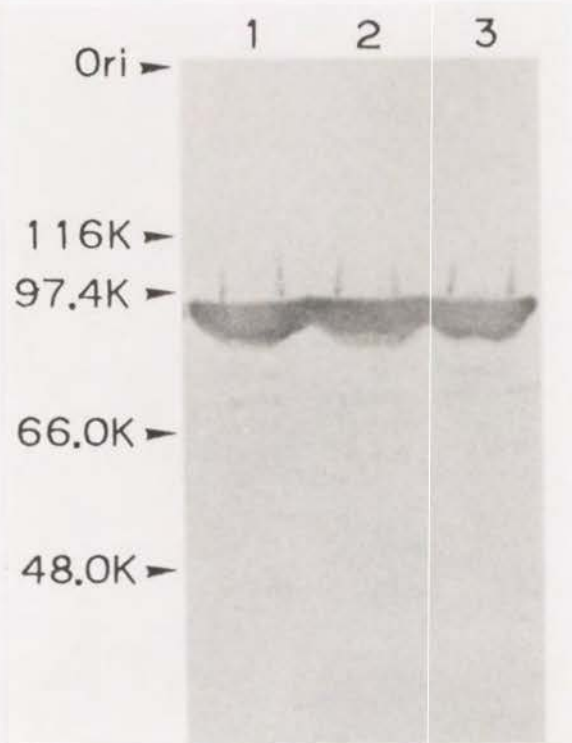


図18 ウェスタン・ブロッティングによる
His579置換体の検出

各 13.5 μ g蛋白質の硫酸アンモニウム分画後の標品を SDS-PAGEによって分離後メンブレンへ転写し、抗大腸菌 PEPC抗体によって検出した。レーン1、野生型酵素；レーン2、H579N；レーン3、H579P。

った。また変異型酵素と野生型酵素のサブユニット当りの分子量が電気泳動的に区別できないことを考えると、変異型酵素は完全な長さのペプチドであることを示している。

つぎに、His138を Asnに置換した変異型酵素 (H138N) の活性の有無を検討するために、F15と PCR1株の形質転換体を調製したところ、これら2つの宿主のグルタミン酸要求性を相補できず、活性を失っているかもしれないもしくは極めて低い活性しかもたないことが示唆された。PCR1株は *recA*⁻であるものの、点突然変異による *ppc*欠損株であり、RecA非依存的な組換えや、不完全な遺伝子翻訳産物による相補¹²²⁾が考えうるために、活性がほとんどないと考えられるH138Nの発現はF15株を宿主として行った。このとき培養は最少培地にグルタミン酸を添加して行った。F15株を宿主としたときの粗酵素液中のH138NとH579Nの比活性を表9に示す。粗酵素液中のH138Nは、形質転換していないF15株の粗酵素液と同じく活性が全くみられなかった。H138Nが大腸菌内で発現していることをウェスタン・ブロッティングで確認したところ (図19)、野生型酵素とほぼ同じ濃さのバンドが同じ位置に観察され、発現量と分子量が確認された。

表9 大腸菌 F15株形質転換体の粗酵素液の比活性

活性測定は標準反応混液 (5 mM PEP) にジオキサン (1.17M) をアクチベーターとして加えた。

Transformants	Activity (units·mg ⁻¹ protein)
F15	<0.01
F15/pS2	3.0
F15/pSH138N	<0.01
F15/pSH579N	1.2

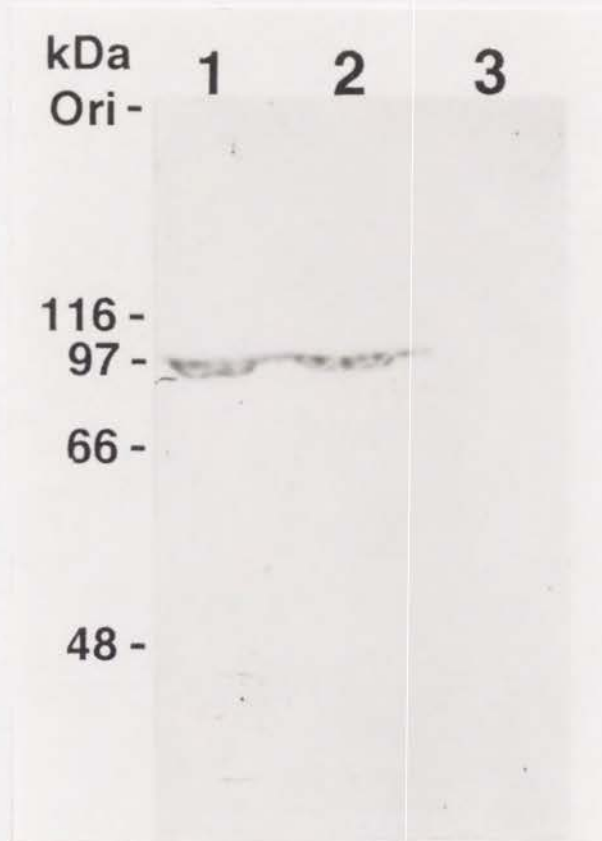


図19 ウェスタン・ブロッティングによる H 1 3 8 N 発現の確認

各 20 μ g の粗酵素液を SDS-PAGE によって分離後メンブレンへ転写し、抗大腸菌 PEPC 抗体によって検出した。
 レーン1、F15/pSH138N；レーン2、F15/pS2；
 レーン3、F15

各宿主を野生型酵素のプラスミド (pS2) で形質転換すると、PCR1株の形質転換体の方が F15株のときよりも約3倍発現量が多かった (表8、9)。この原因は不明であるが、宿主ごとの特性によるものと考えられる。

粗酵素液中で H 5 7 9 N は野生型酵素の40%の比活性を有していた。

PCR1株を形質転換したとき (表8) よりも高い比活性を示すのは、野生型酵素がジオキサン存在下、2 mM以上の PEP濃度で飽和しているのに対して、H 5 7 9 N が飽和していないことによると推測される。

Ⅲ-2 H 5 7 9 N と H 5 7 9 P の部分精製

H 5 7 9 N、H 5 7 9 P の精製の結果を表 1 0、1 1 に示す。表に示すように H 5 7 9 N は収率 5 5 % で比活性 5.7 units/mg、H 5 7 9 P は収率 7 1 % で比活性 0.58 units/mg の標品が得られた。このときの活性測定条件は野生型酵素の至適条件を参考にして設定したので、変異型酵素の至適条件ではない。これら 2 つの標品の SDS-PAGE を行ったら、約 5 0 % 程度の純度を有していることがわかった。得られた部分精製標品は NADH oxidase 等の妨害酵素を含まないことが確認されたので、以後速度論的な解析に使用した。

各変異型酵素を DEAE-Toyopearl イオン交換カラムクロマトグラフィーによって精製した時、各変異型酵素は野生型酵素と同じく 0.20 M NaCl で溶出した。このことは His 579 の置換によっても酵素の全体的表面電荷がほとんど変化しなかったことを示唆するものである。

表 1 0 H 5 7 9 N の部分精製

Procedure	Volume (ml)	Total protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity (units/mg)	Yield (%)
Crude extract ^a	54.0	1,260	1,120	0.89	100
Streptomycin treatment	67.0	1,210	1,070	0.94	95.5
Ammonium sulfate fractionation (38-55% saturation)	27.0	502	645	1.33	58.0
DEAE-Toyopearl chromatography	15.0	108	612	5.67	54.6

^a 湿重量 14.2 g の菌体より調製した。活性測定は標準反応混液の PEP 濃度を 2 mM に変更し、1.17 M ジオキサンを加えて行った。

表 1 1 H 5 7 9 P の部分精製

Procedure	Volume (ml)	Total protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity (units/mg)	Yield (%)
Crude extract ^a	59.0	1,290	88.6	0.069	100
Streptomycin treatment	63.0	1,140	92.5	0.081	104
Ammonium sulfate fractionation (38-55% saturation)	26.0	655	76.1	0.111	82.7
DEAE-Toyopearl chromatography	20.0	110	63.4	0.576	71.5

^a 湿重量 16.4 g の菌体より調製した。活性測定条件は表 1 0 と同じ。

Ⅲ-3 H138NとH579Nの均一精製

大腸菌 F15株で発現させたH138NとH579Nの均一精製を行った。均一精製は、粗酵素液から（a）硫酸アンモニウム分画（38-55%飽和）、（b）Q-Sepharoseイオン交換クロマトグラフィー、（c）Butyl-Toyopearl疎水カラムクロマトグラフィーの3段階で行った。H579Nについては Superose 12ゲル濾過カラムを用いたFPLCによって、さらに精製した。このときのH579Nの精製表を表12に示す。活性の測定は表10の測定条件よりもジオキサン濃度とPEP濃度（5 mM）を増して行った。活性の検出されなかったH138Nは、各精製段階における蛋白量のみを示した（表13）。H138Nの検出は大腸菌酵素に対する抗体もしくは SDS-PAGEによって検出される分子量約10万のバンドを指標に行った。

表12 H579Nの均一精製

Procedure	Volume (ml)	Total protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity (units/mg)	Yield (%)
Crude extract ^a	86.7	2,300	5,680	2.47	100
Streptomycin treatment	91.0	2,230	6,220	2.78	109
Ammonium sulfate fractionation (38-55% saturation)	34.0	1,220	6,460	5.29	114
Q-Sepharose chromatography	20.5	127	4,990	39.3	87.8
Butyl-Toyopearl chromatography	9.8	49.0	3,690	75.4	65.0
Superose 12 FPLC	8.0	20.4	1,590	78.5	30.0

^a湿重量 35.4 g の菌体から調製した。活性測定は標準反応混液に、1.75 Mジオキサンを加えて行った。

表13 H138Nの各精製段階における蛋白量

Procedure	Volume (ml)	Total protein (mg)
Crude extract ^a	100	2,250
Streptomycin treatment	103	2,270
Ammonium sulfate fractionation (38-55% saturation)	31.0	822
Q-Sepharose chromatography	22.0	119
Butyl-Toyopearl chromatography	9.3	30.7

^a湿重量 30.0 g の菌体から得た。

図 20 は H 1 3 8 N と H 5 7 9 N の Q-Sepharose イオン交換クロマトグラムを示す。各変異型酵素はともに 0.24 M の NaCl で溶出した。Q-Sepharose と同じ性状のイオン交換体である MonoQ カラムを F P L C で用いた予備実験から、野生型酵素も各変異型酵素と同じ NaCl 濃度で溶出することが示された。したがって H 1 3 8 N と H 5 7 9 N の全体的表面電荷は、野生型酵素と変わらないものと思われた。

野生型酵素は、Butyl-Toyopearl に 0.67 M の硫酸アンモニウム存在下で吸着するが、さらにアスパラギン酸を添加すると特異的に溶離する性質があり、この性質を利用した一段階のクロマトグラフィーによって野生型酵素は均一に精製できる^{114, 133, 134)}。しかし変異型酵素の場合、この方法はさほど有効でないことが予備的検討により明らかになっていたので、Q-Sepharose カラムクロマトグラフィー後の各変異型酵素の精製は、次のような Butyl-Toyopearl 疎水クロマトグラフィーによって行った (図 21)。各変異型酵素は 0.8 M 硫酸アンモニウムで吸着させて、硫酸アンモニウムの濃度を直線的に下げる方法で溶出した。このとき用いた緩衝液中には、はじめからアスパラギン酸を添加しておいた。野生型酵素はこの条件で 0.73 M の硫酸アンモニウム濃度で溶出するが¹¹⁴⁾、H 1 3 8 N も同じ濃度で溶出した。H 5 7 9 N は野生型酵素や H 1 3 8 N と異なり、0.57 M で溶出した。得られた酵素標品の純度を検討するために SDS-PAGE を行った。H 1 3 8 N の Butyl-Toyopearl カラムクロマトグラフィー後の標品は PEPC 以外のバンドが全く検出されず、均一に精製されていた。これに対して H 5 7 9 N の標品は PEPC のバンドの他にいくつかの薄いバンドが明かに観察された。これらの混在蛋白質は H P L C を用いたゲル濾過の実験 (後述) から、非変性条件下で主に分子量 14 万以下と考えられたので、Superose 12 ゲル濾過カラムを用いた F P L C によって、さらに精製を行った (図 22)。PEPC の回収率は約 50 % になったが、混在蛋白質を除くために分子量 20 万以下の画分を除いた。

各最終精製標品の純度の検定は、比較的多量の標品 (5 μ g) を用いた SDS-PAGE により行い、それぞれの標品は 95 % 以上の純度を有することが確認された (図 23)。

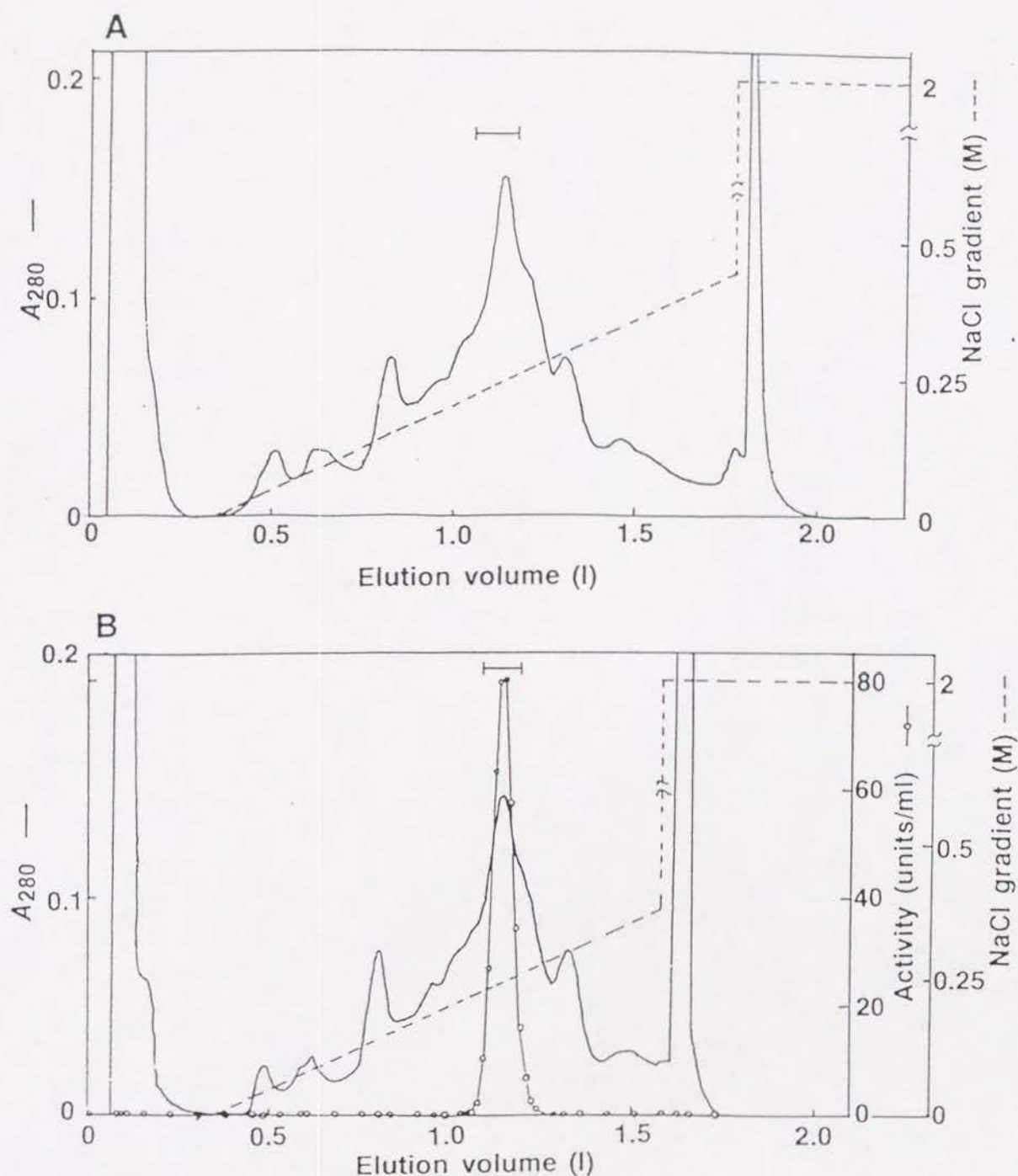


図20 Q-Sepharoseイオン交換カラムクロマトグラフィー

(A) はH138Nの、(B) はH579Nのクロマトグラムを示す。カラムサイズは $\phi 1.6 \times 60$ cm、流速は $75 \text{ ml/hr} \cdot \text{cm}^2$ である。NaClの濃度を 0 Mから約 0.5 Mまで直線的に上昇させて溶出を行った。カラムの平衡化および溶出液の緩衝液としては5%グリセロールを含む緩衝液Bを用いた。溶出後、2 M NaCl溶液でカラムの洗浄を行った。図中水平の棒は集めた PEPC画分を示す。

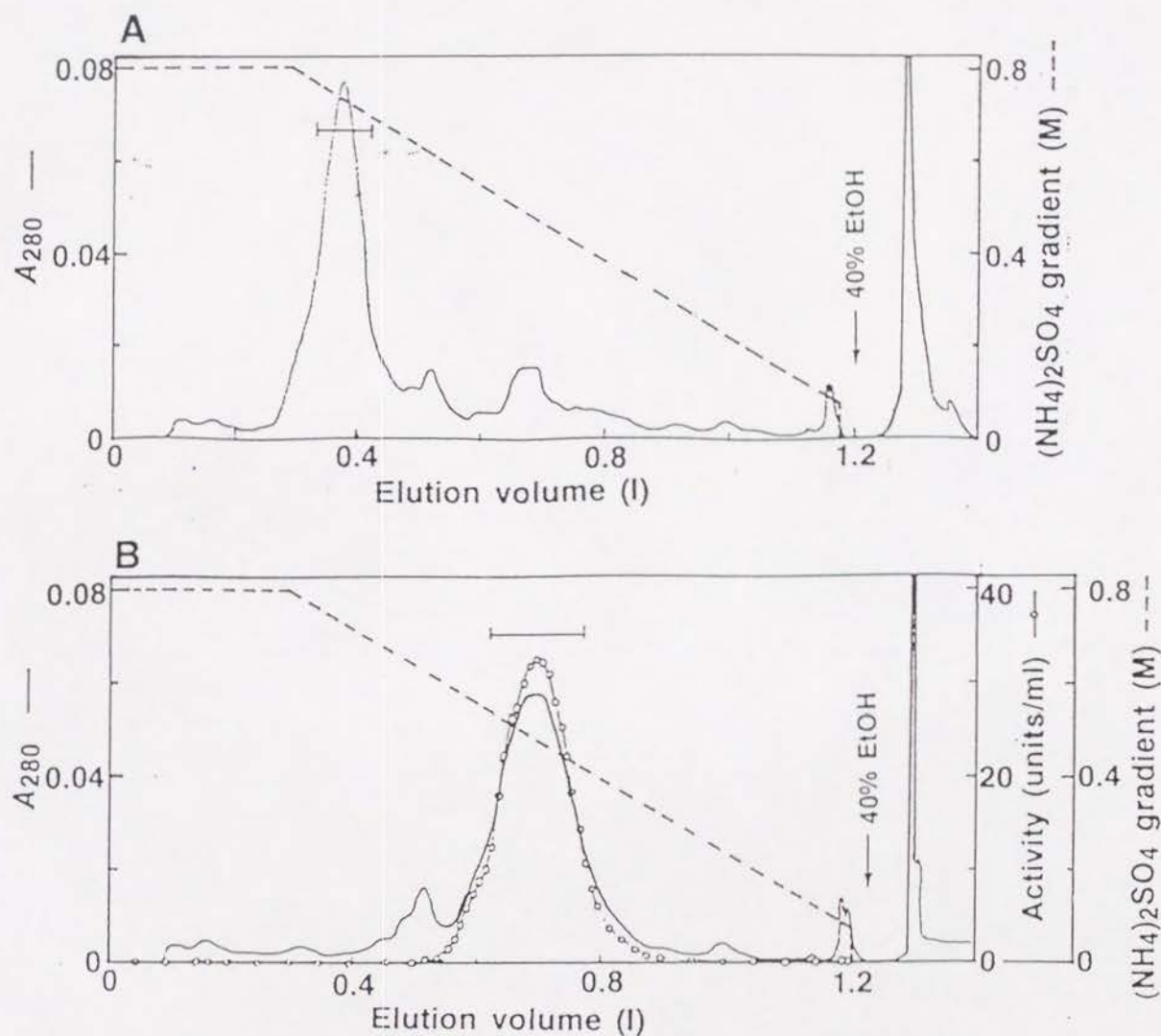


図 2 1 Butyl-Toyopearl疎水カラムクロマトグラフィー

(A) は H138N の、(B) は H579N のクロマトグラムを示す。カラムサイズは $\phi 2.6 \times 21$ cm、流速は $17.9 \text{ ml/hr} \cdot \text{cm}^2$ である。硫酸アンモニウムの濃度を 0.8 M から約 0.1 M まで直線的に下降させて溶出を行った。カラムの平衡化および溶出液の緩衝液としては緩衝液 C を用いた。溶出後、50 mM Tris- H_2SO_4 (pH 7.4) と 40% エタノール溶液でカラムを洗浄した。図中水平の棒は集めた PEPC 画分を示す。

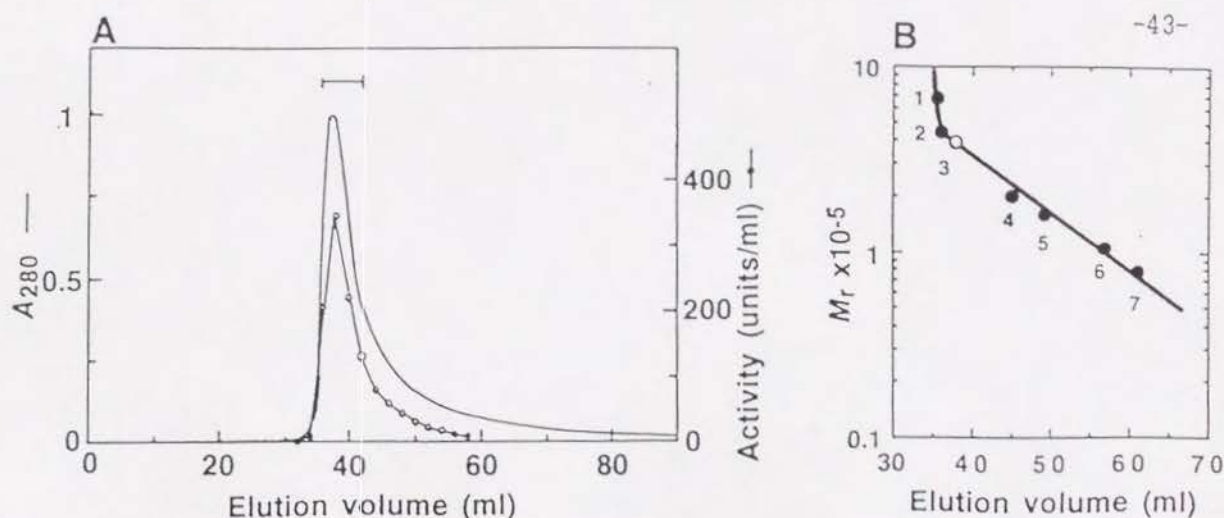


図 2 2 Superose 12ゲル透過カラムクロマトグラフィー

(A) は H 5 7 9 N のクロマトグラムを示す。カラムサイズは $\phi 1.6 \times 50$ cm、流速は 60 ml/hr \cdot cm² である。試料は 40 mg (2 ml) を緩衝液 D に溶かしカラムに加えた。カラムの平衡化および溶出液としては緩衝液 D を用いた。図中水平の棒は集めた PEPC 画分を示す。(B) は校正曲線を示す。H 5 7 9 N の溶出位置は野生型酵素のものと一致しており、図中白丸 (○) で示した。用いた標準蛋白質とその分子量を以下に記す。

1. thyroglobin (669 kDa); 2. ferritin (450 kDa); 3. 野生型 PEPC (396 kDa);
4. β -amylase (200 kDa); 5. alcohol dehydrogenase (158 kDa, tetramer);
6. hexokinase (104 kDa); 7. alcohol dehydrogenase (79 kDa, dimer)



図 2 3 各変異型酵素の最終精製標品の SDS-PAGE

野生型酵素 (WT) と図中に示した各変異型酵素の最終精製標品 (各 5 μ g) を Laemmli の方法による SDS-PAGE¹³⁵⁾ に供した。MW は分子量マーカーである。用いた標準蛋白質とその分子量は以下に記す。

1. myosin, rabbit muscle (205 kDa); 2. β -galactosidase (116 kDa); 3. phosphorylase b, rabbit muscle (97.4 kDa); 4. albumin, bovine plasma (66 kDa); 5. ovalbumin (45 kDa);
6. carbonic anhydrase (29 kDa)

III-4 変異型酵素の分子的性質

H 5 7 9 N と H 5 7 9 P の熱安定性を調べるため、各部分精製標品を 55℃ で保温後、その残存活性を測定した (図 24)。この温度で 50% 失活するのに要する時間は野生型酵素が 3.0 分、H 5 7 9 N は 2.0 分、H 5 7 9 P は 0.3 分であった。H 5 7 9 N は野生型酵素に比べてやや熱安定性に欠けているものの、それほど大きな違いはないものと思われる。これに対して H 5 7 9 P の熱安定性は著しく減少していた。

H 1 3 8 N と H 5 7 9 N の精製標品を温度を変えて 5 分間加温し、残存活性を調べたのが図 25 である。5 分間の加温で 50% 失活するのに要する温度は野生型酵素と H 1 3 8 N が 54℃、H 5 7 9 N が 53℃ であった。活性のなかった H 1 3 8 N は部分反応の触媒活性を測定した (後述)。

各変異型酵素は野生型酵素と異なり、Butyl-Toyopearl カラム上でアスパラギン酸の添加による特異的溶出が不可能であった。各変異型酵素と野生型酵素の Butyl-Toyopearl ゲルへの吸着性の相違点を、アスパラギン酸の共存、非共存下で詳しく調べるために、室温 (25℃) で F P L C システムを用いた実験を行った。野生型酵素は、アスパラギン酸非存在下で 0.32 M の硫酸アンモニウム濃度で溶出したが、10 mM のアスパラギン酸存在

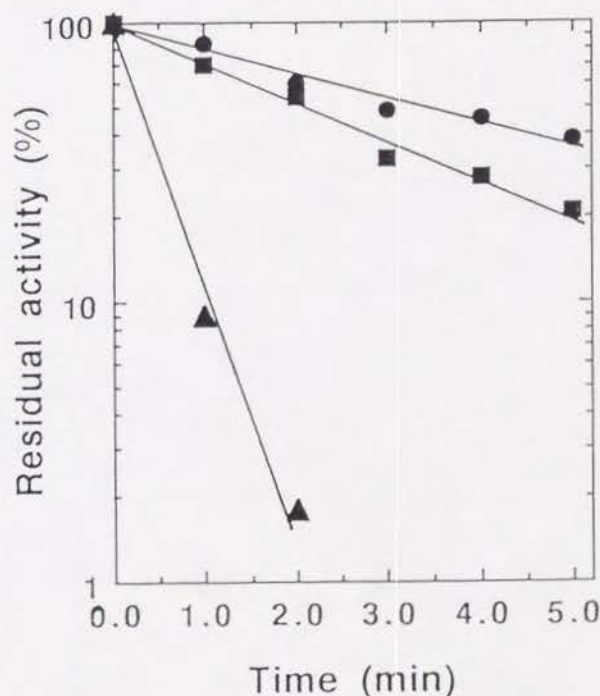


図 24 H 5 7 9 N (■)、H 5 7 9 P (▲) および野生型酵素 (●) の熱安定性

各変異型酵素の部分精製標品 (1.0 mg/ml) を 0.1 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4) 中で 55℃ で保温し、表示した時間に残存活性を測定した。

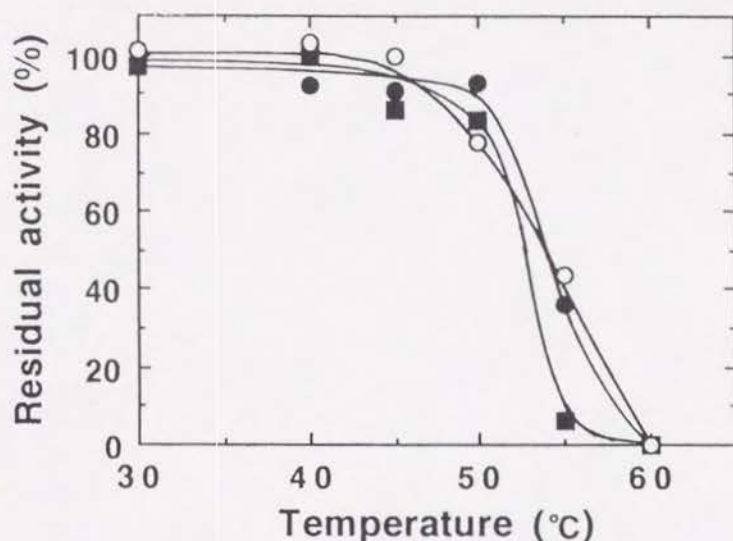


図2.5 H138N (○)、H579N (■) および野生型酵素 (●) の熱安定性

各変異型酵素の精製標品 (0.5 mg/ml) を 0.1 Mリン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4) 中、表示した温度で5分間加温し、残存活性を測定した。H138Nは PEPの脱リン酸化活性を測定した。

下では 0.54 Mで溶出した。これに対してH138Nが溶出する硫酸アンモニウム濃度は 0.42 Mと 0.54 Mであり、アスパラギン酸非存在下での溶出濃度が増大していた。H579Nはアスパラギン酸の有無にかかわらず 0.32 Mで溶出した (図2.6)。各変異型酵素は野生型酵素に比べると、アスパラギン酸の添加が Butyl-Toyopearlゲルへの吸着性に及ぼす効果は小さかった。このことが各変異型酵素の精製に野生型酵素と同じ方法を適用できなかった原因と考えられる。しかしながらH138NとH579Nが溶出する硫酸アンモニウム濃度の範囲は、野生型酵素の範囲にあり、大きな構造的変化がアスパラギンへの置換によってもたらされたとは考えがたい。一般に、温度が減少すると疎水的相互作用が弱まることが知られている。PEPCの Butyl-Toyopearlゲルへの吸着は、hexyl-Sepharoseゲル¹³³⁾と同様に主に疎水的相互作用によるものと考えられている¹¹⁴⁾。野生型酵素、H138NならびにH579Nは、室温 (20°C) で溶出したときよりも、4°Cで精製した時の方が溶出する硫酸アンモニウム濃度が高くなっていた。

各変異型酵素が野生型酵素と同じく4量体構造をとっているかどうか調べるために G4000SWゲル濾過カラムを用いてHPLCを行った (図2.7)。

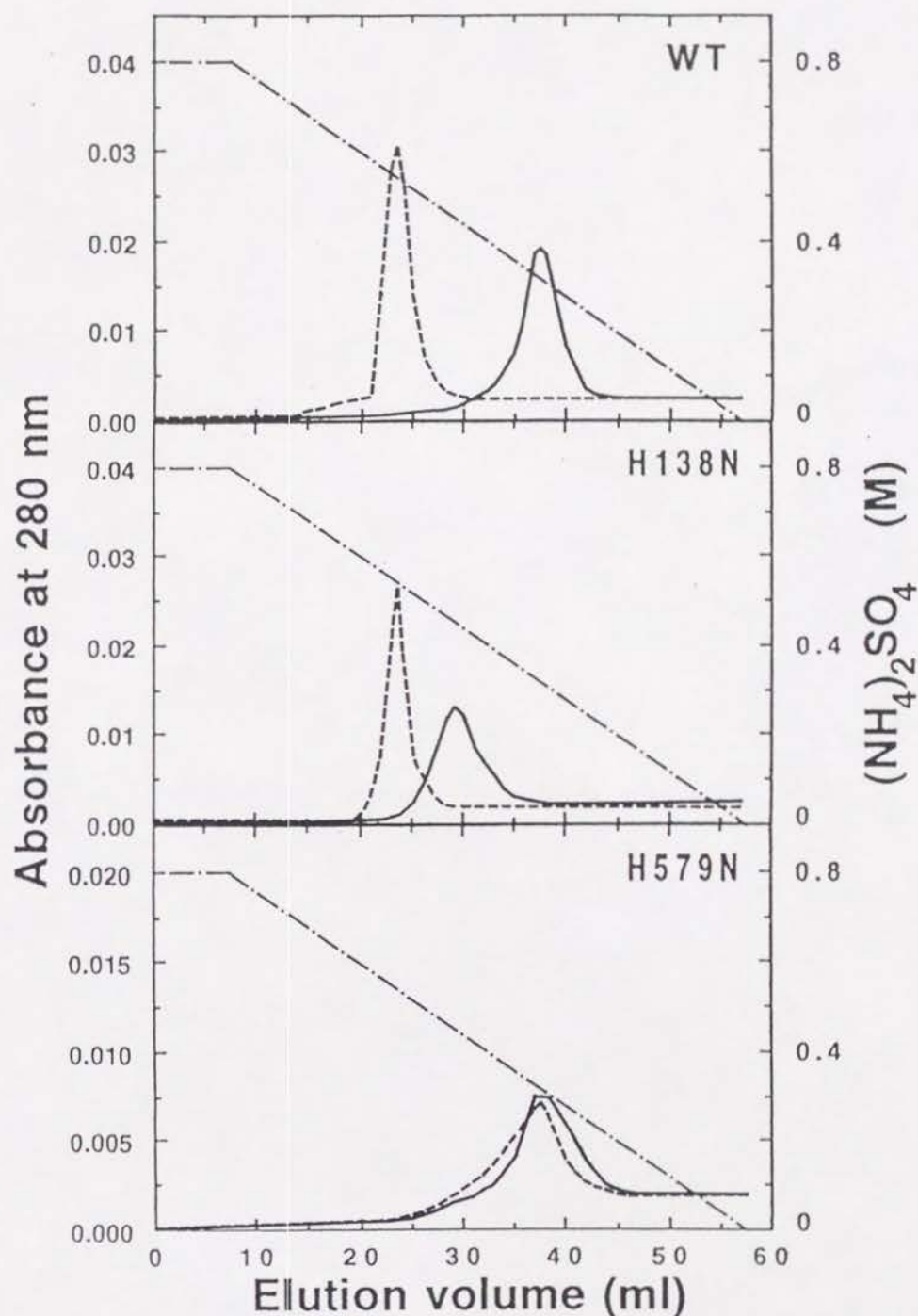


図26 野生型酵素 (WT) と H138N、H579N の Butyl-Toyopearl カラムクロマトグラフィー

Butyl-Toyopearl 650S カラム ($\phi 1.0 \times 6.3$ cm) を用いて、アスパラギン酸 (10 mM) の存在、非存在下、室温で FPLC を行った。流速は $19.1 \text{ ml/hr} \cdot \text{cm}^2$ である。試料 (0.2–0.5 mg) は緩衝液 C で平衡化したカラムに加え、0.8–0 M の硫酸アンモニウムの直線的濃度勾配により溶出した。PEPC の検出は 280 nm の吸光度を測定することにより行った。直線はアスパラギン酸非存在下のクロマトグラム。点線は 10 mM アスパラギン酸存在下のクロマトグラム。一点鎖線は硫酸アンモニウム濃度を示す。

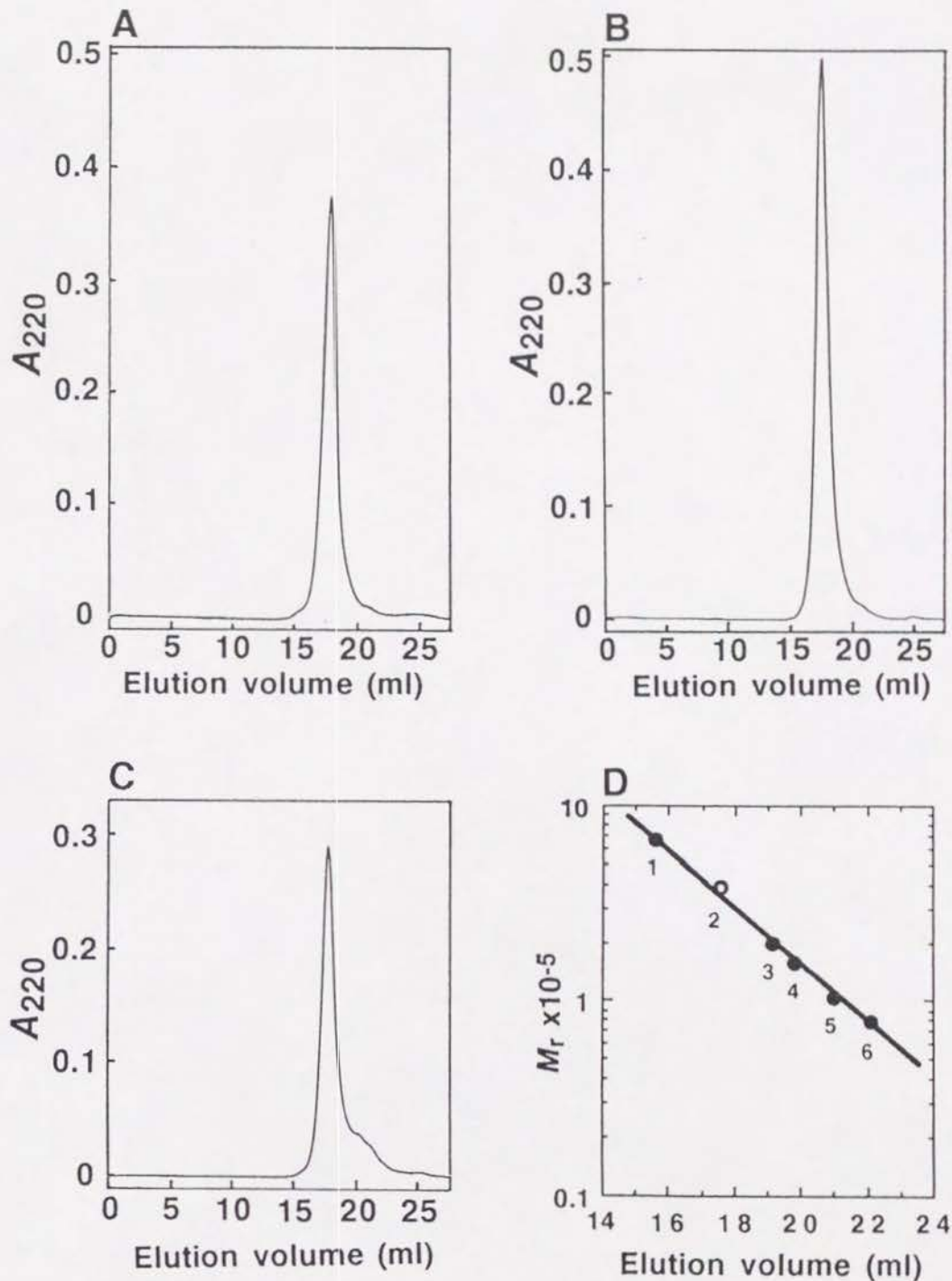


図 2-7 G 4000SWゲル濾過カラムによるHPLC

(A) は野生型酵素、(B) はH138N、(C) はH579Nのクロマトグラムを示す。H579Nは Butyl-Toyopearlカラムクロマトグラフィー後の標品を用いているために、4量体に相当するメインピークの他に、分子量約14万の溶出位置に小さな肩が現れている。カラムサイズは $\phi 0.75 \times 60$ cm、流速は 0.5 ml/minである。試料は約 50 μ g (0.1 ml)を用いて、0.1 Mリン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4)で溶出をおこなった。(D) は校正曲線を示す。各変異型酵素の溶出位置は野生型酵素のものと一致しており、図中白丸(○)で示した。用いた標準蛋白質とその分子量を以下に記す。

1. thyroglobin (669 kDa); 2. 野生型 PEPC (396 kDa); 3. β -amylase (200 kDa);
4. alcohol dehydrogenase (158 kDa, tetramer); 5. hexokinase (104 kDa);
6. alcohol dehydrogenase (79 kDa, dimer)

野生型酵素、H 1 3 8 NならびにH 5 7 9 Nは4量体の分子量に相当する溶出位置に大きなピークとして観察された。野生型酵素、H 1 3 8 Nはこれ以外の溶出位置にピークは全くみられなかったが、H 5 7 9 NはButyl-Toyopearlカラムクロマトグラフィー後の標品を用いたために、4量体に相当するピークの他に、分子量約14万の溶出位置に小さな肩が現れた。しかしながらこの溶出位置に相当するPEPCのオリゴマーは考えにくく、活性は見いだされなかったもので、単なる混在蛋白質であると思われた。H 5 7 9 Pの部分精製標品を用いた実験でも、4量体に相当する溶出位置以外に活性がみられなかった。したがって各変異型酵素は野生型酵素と同じく4量体構造をとっていると確認された。

III-5 His579置換体の酵素学的性質

His579置換体の酵素学的性質の変化を調べるために、主に各変異型酵素の部分精製標品を用いて、以下の実験を行った。またH 5 7 9 Nについては均一精製標品を用いて、最大速度を決定した。

(1) 速度論的性質

まず野生型酵素とH 5 7 9 N、H 5 7 9 Pの部分精製標品を用いてPEPに対する半飽和濃度 $S_{0.5}$ を求めた。PEPCは活性化因子非存在下では活性が弱いので、活性化因子としてCoASAcを標準反応混液に添加した。図28は2 mM CoASAc存在下におけるPEPの飽和曲線を示す。野生型酵素の半飽和濃度 ($S_{0.5}$) は野生型酵素が0.16 mMであるのに対して、H 5 7 9 Nは3.7 mM、H 5 7 9 Pでは3.5 mMと24倍程度変わっていた。野生型酵素の精製標品の最大速度 V_{max} が154 units/mgであるのに対して、変異型酵素の部分精製標品の見かけの最大速度 $V_{max,app}$ はH 5 7 9 Nが45 units/mg protein、H 5 7 9 Pは8.3 units/mg proteinであった。

さらにH 5 7 9 Nの均一精製標品については、最大速度の絶対値を求めた(図29)。このとき、野生型酵素と共にCoASAc非存在下でのPEPの飽和曲線も求めた。H 5 7 9 Nは2 mM CoASAc存在下で、最大速度は106 units/mgと野生型酵素(154 units/mg)の70%に達した。これに対して

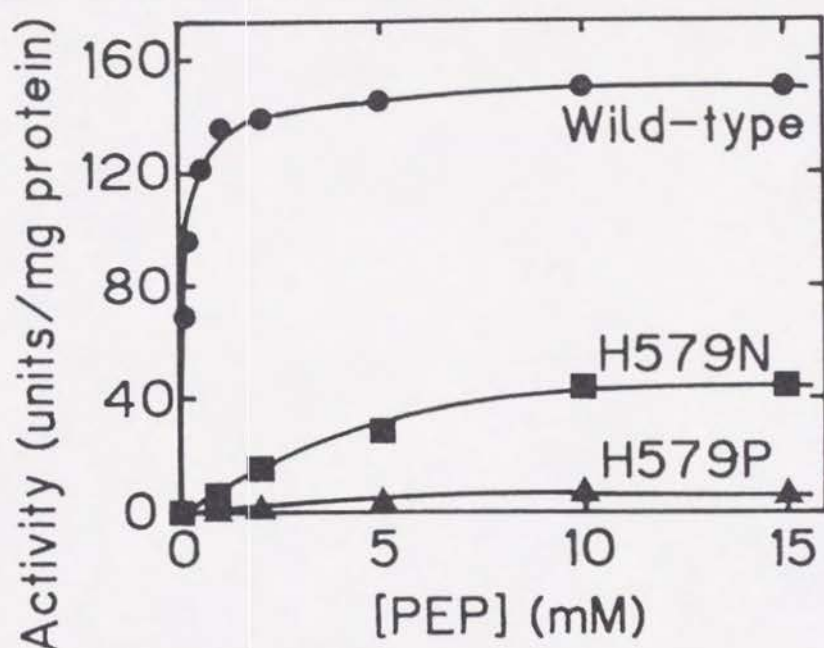


図 28 野生型酵素と H 5 7 9 N、H 5 7 9 P の PEP の飽和曲線

各変異型酵素は部分精製標品を用いた。標準反応混液に 2 mM CoASAc を加えて測定を行った。

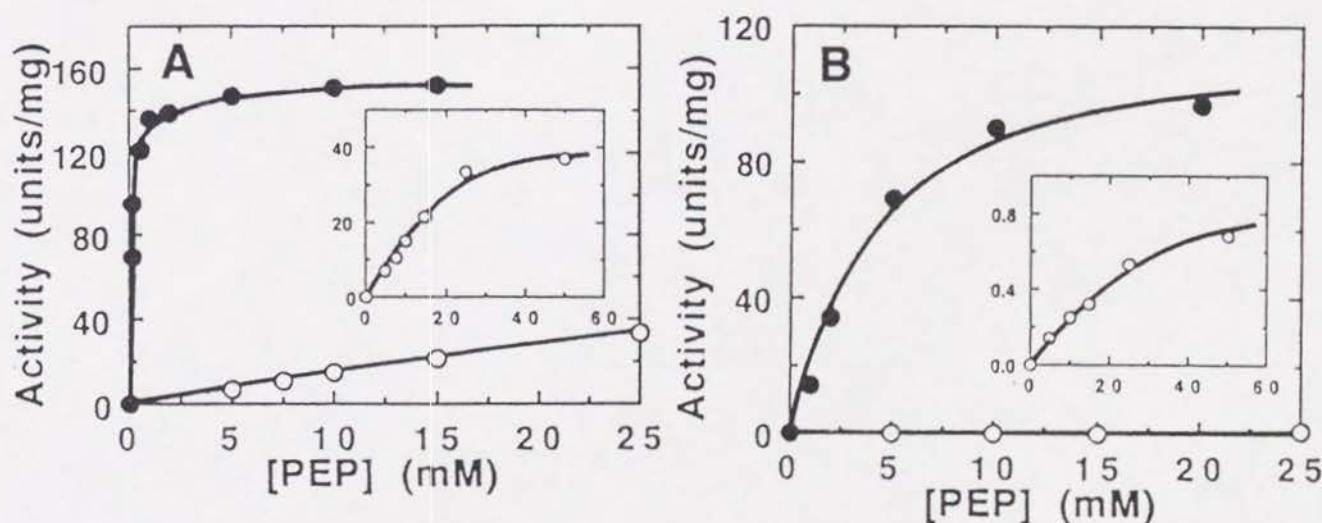


図 29 野生型酵素 (A) と H 5 7 9 N (B) の PEP の飽和曲線

均一精製標品を用いて活性化因子非存在下 (○)、2 mM CoASAc 存在下 (●) での飽和曲線を示す。活性測定は標準反応混液を用いて行った。(挿入図) 活性化因子非存在下での飽和曲線を求めた。多量の酵素および高濃度の PEP を要するため、全反応溶液を 100 μ l とし、特殊なマイクロ光学セルを用いて測定した。

CoASAc非存在下では、H579Nの最大速度 (1.24 units/mg) は野生型酵素 (43.3 units/mg) の3%に過ぎなかった。活性化因子のないときのPEPに対する半飽和濃度 $S_{0.5}$ は、野生型酵素が 16.0 mM、H579Nが 39.3 mMであり、2.5倍の違いであった。

次にもう一つの基質である HCO_3^- に対する半飽和濃度 $S_{0.5}$ を、各部分精製標品を用いて求めた。図30に 2 mM PEP、2 mM CoASAc存在下における HCO_3^- の飽和曲線を示す。なお以下の飽和曲線を示した図では、各酵素についての最大活性を100%として相対値で示した。 HCO_3^- は本酵素の基質の一つであり、本来ならば HCO_3^- 無添加の場合に活性は0になるべきだが、反応混液中に溶存する HCO_3^- によって有意の活性を与えた。この濃度を補外によって約 0.3 mMと見積ると HCO_3^- の半飽和濃度 $S_{0.5}$ は、野生型酵素で 0.15 mM、H579NとH579Pはともにその2倍程度であった。

図31は、コファクターである Mg^{2+} の飽和曲線を示す。PEPと CoASAcの濃度は HCO_3^- に対する半飽和濃度を求めたときと同じ条件である。 Mg^{2+} の半飽和濃度 $S_{0.5}$ は、野生型酵素で 0.4 mM、H579NとH579Pでは共にその約4倍大きくなっていた。

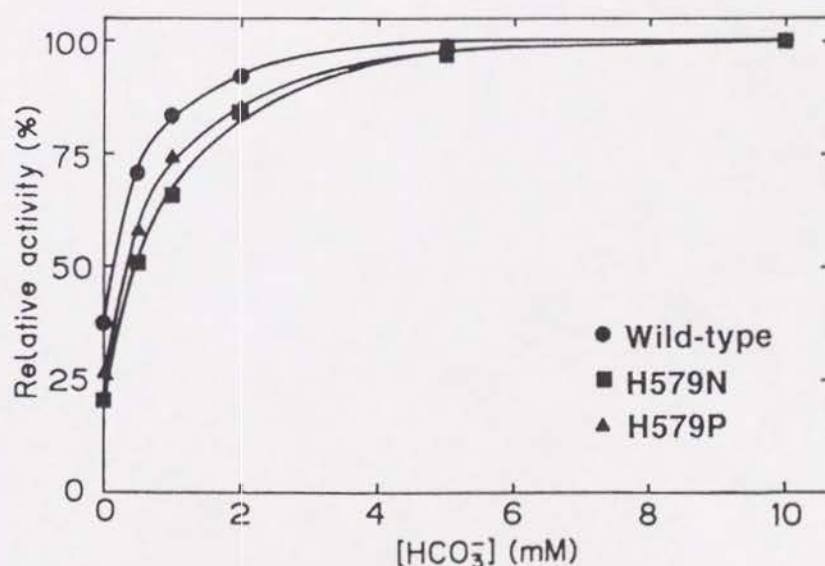


図30 HCO_3^- の飽和曲線

各変異型酵素は部分精製標品を用いた。活性測定は標準反応混液中の PEP濃度を 2 mMに変更し、2 mMの CoASAcを加えた。

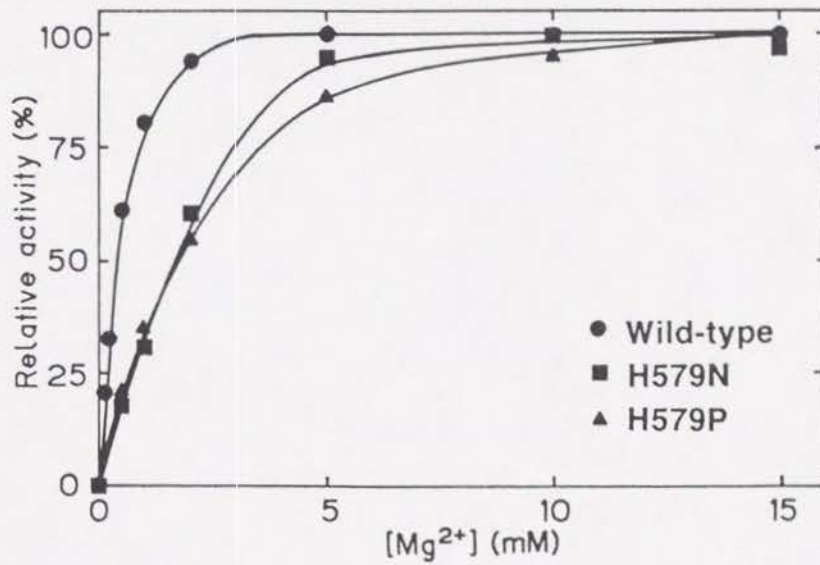


図3-1 Mg^{2+} の飽和曲線

各変異型酵素は部分精製標品を用いた。反応条件は図3-0に同じ。

以上述べてきた His579の置換体の速度論的性質を、表1-4にまとめた。置換が酵素活性に及ぼした影響は、 HCO_3^- や Mg^{2+} に対する $S_{0.5}$ の値よりも PEPに対する $S_{0.5}$ の値に、より顕著に現れていた。

表1-4 野生型酵素、H579NおよびH579Pの速度論的性質

Enzyme	V_{\max} (units/mg)	Hill coefficient n	$S_{0.5}$ (mM)		
			PEP	HCO_3^-	Mg^{2+}
Without activator					
Wild-type	43.3	1.5	16.0	ND	ND
H579N	1.24	1.0	39.3	ND	ND
With 2 mM CoASAc					
Wild-type	154	1.0	0.16	0.15	0.20
H579N	106	1.5	3.7	0.50	2.7
H579Pa	(8.3)	ND	3.5	0.30	1.5

^{a)} 部分精製標品を用いた時の値。NDは未定。

(2) 酵素活性の pH 依存性

図 3 2 は、各酵素の pH 依存性を示す。活性測定を、10 mM PEP、2 mM CoASAc 存在下で行ったところ、H 5 7 9 N と H 5 7 9 P の pH プロフィールは野生型酵素のものとはほぼ同じであり、至適 pH はいずれも 8.5-9.0 であった。

(3) アロステリック・エフェクターに対する感受性

His579 を置換した変異型酵素では、アロステリック・エフェクターに対する感受性にどのような変化が見られるのか検討するために、エフェクターに対する半飽和濃度 $A_{0.5}$ もしくは $I_{0.5}$ を求めた。なお以下の実験では部分精製標品を用いた。

図 3 3 は第 1 の活性化因子である CoASAc の飽和曲線を示す。以下の実験では標準反応混液中の Mg^{2+} 濃度を 2 倍にした。これは、活性化因子の一部 (FBP や GTP など) がコファクターである Mg^{2+} をキレートして、 Mg^{2+} の有効濃度の低下をきたすのを防ぐためである。CoASAc の半飽和濃度 $A_{0.5}$ は、野生型酵素で 0.05 mM であったが、H 5 7 9 N、H 5 7 9 P では共にその 20 倍以上であった。

図 3 4 は第 2 の活性化因子であるフルクトース 1,6-ビスリン酸 (FBP) の飽和曲線を示す。FBP の半飽和濃度 $A_{0.5}$ は、野生型酵素で 0.5 mM であったが、H 5 7 9 N でその 8 倍以上、H 5 7 9 P で 5 倍であった。

図 3 5 は、第 3 の活性化因子である GTP の飽和曲線を示す。GTP の $A_{0.5}$ は、野生型酵素で 1.2 mM であったが、H 5 7 9 N、H 5 7 9 P 共にその 3 倍以上であった。

図 3 6 は、第 4 の活性化因子であるラウリン酸の飽和曲線を示す。今まで述べてきた CoASAc、FBP、GTP の時と異なり、ラウリン酸の $A_{0.5}$ は、野生型酵素、変異型酵素共に 0.03 mM であった。

本酵素は 1 M 程度のジオキサン、エタノールなどの有機溶媒によって顕著な活性化を受けるきわめて珍しい性質をもつことが知られている。

図 3 7 は、ジオキサンの飽和曲線を示す。高濃度のジオキサン存在下で酵素活性は減少しているが、これは変性による失活と思われる。ジオキサン

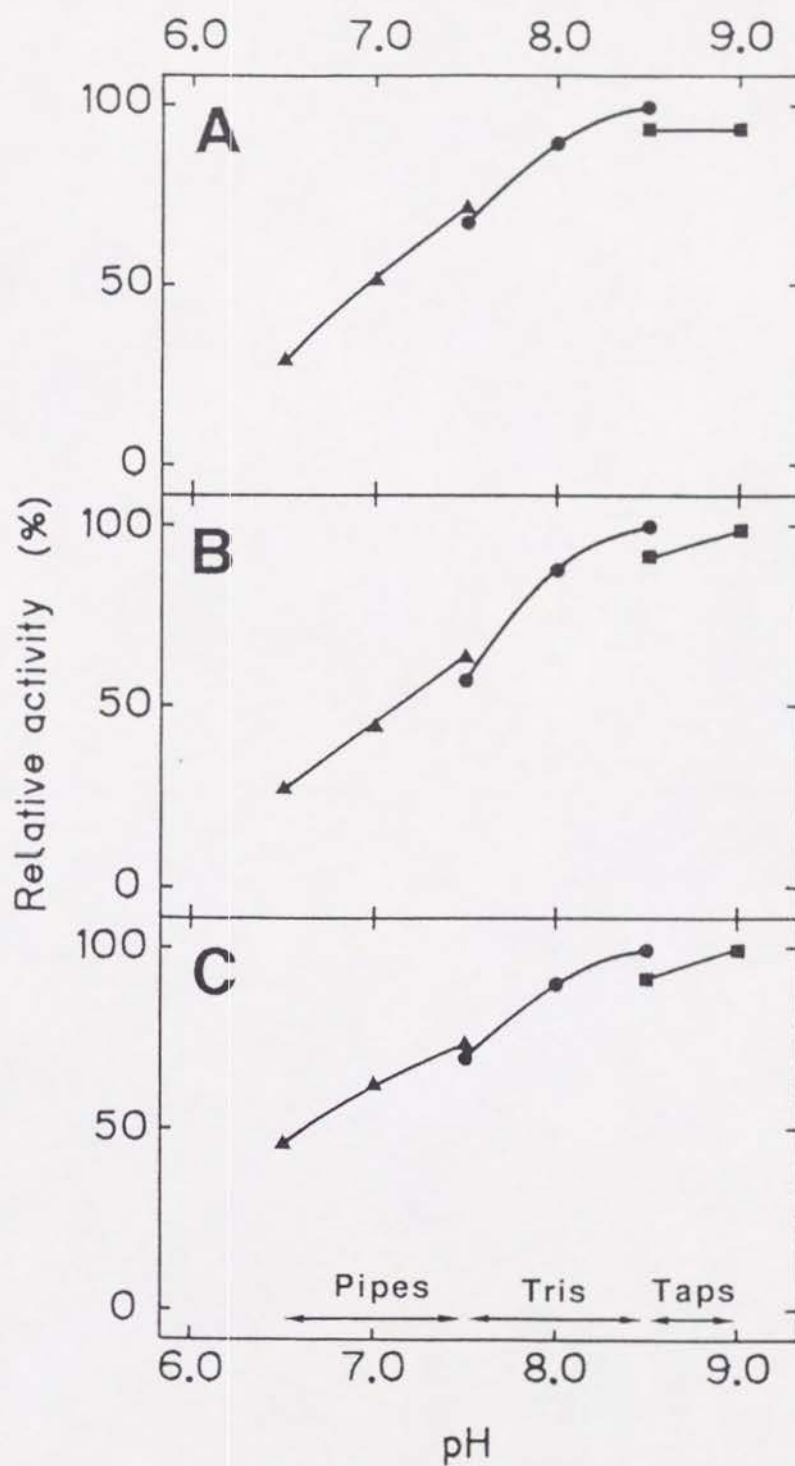


図3-2 H579N (A)、H579P (B)、野生型酵素 (C) の pHプロフィール

各変異型酵素は部分精製標品を用いた。活性測定は標準反応混液中の PEPを 10 mMに変更し、CoASAcを 2 mM加えた。用いた緩衝液は、pH 6.5-7.0は 0.1 M Pipes-KOH (▲)、pH 7.0-8.5は 0.1 M Tris-酢酸 (●)、pH 8.5-9.0は 0.1 M Taps-KOH (■)。

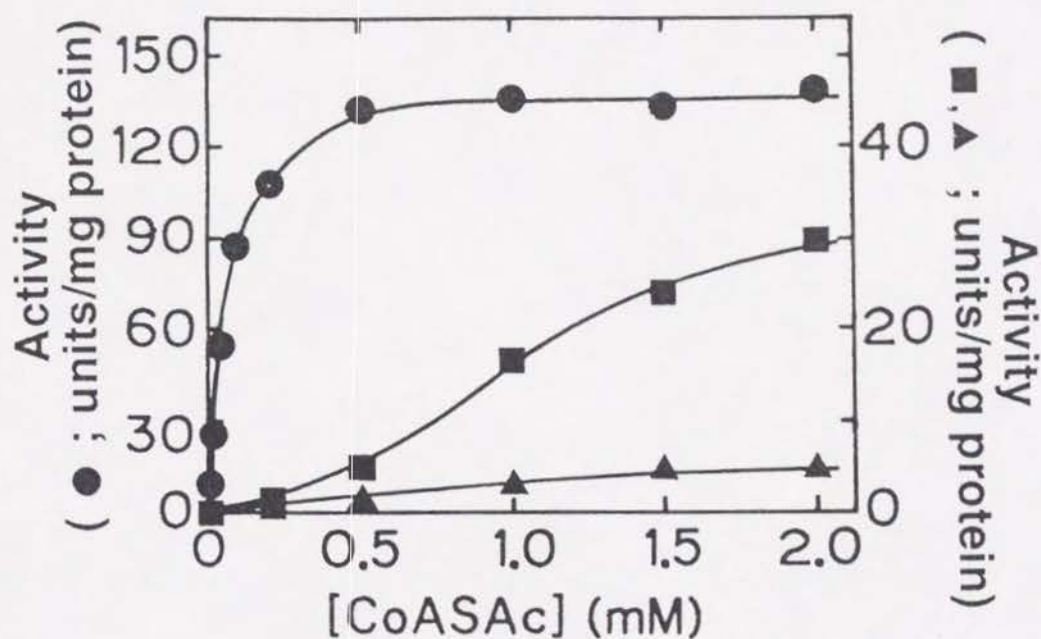


図3.3 H579N (■)、H579P (▲) および野生型酵素 (●) の CoASAc に対する飽和曲線

野生型酵素は均一標品を、各変異型酵素は部分精製標品を用いた。標準反応混液中の Mg^{2+} の濃度は 20 mM に変更した。

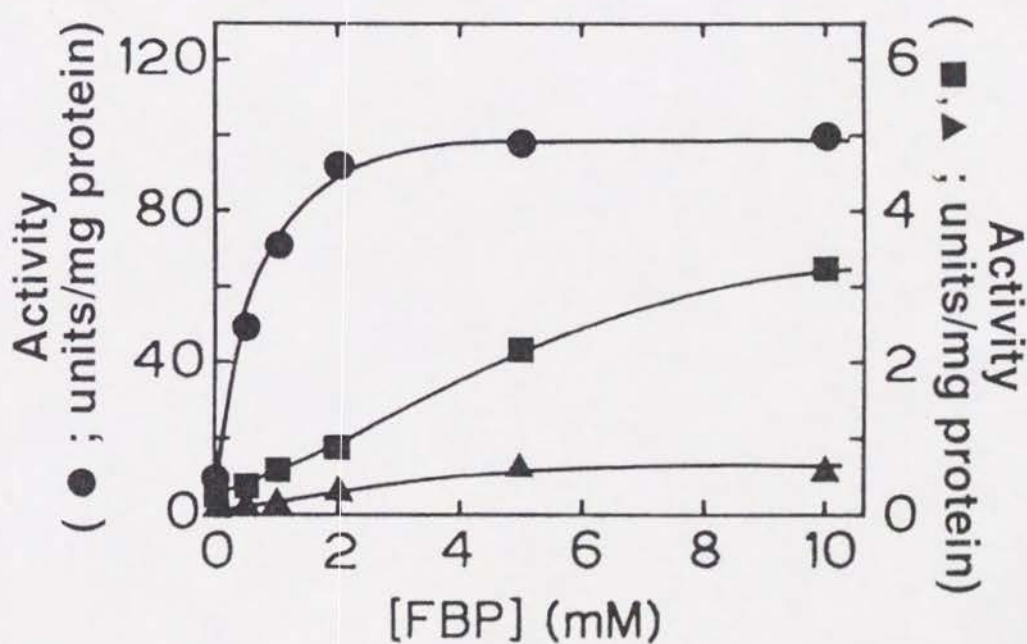


図3.4 H579N (■)、H579P (▲) および野生型酵素 (●) の FBP に対する飽和曲線

野生型酵素は均一標品を、各変異型酵素は部分精製標品を用いた。反応条件は、図3.3に同じ。

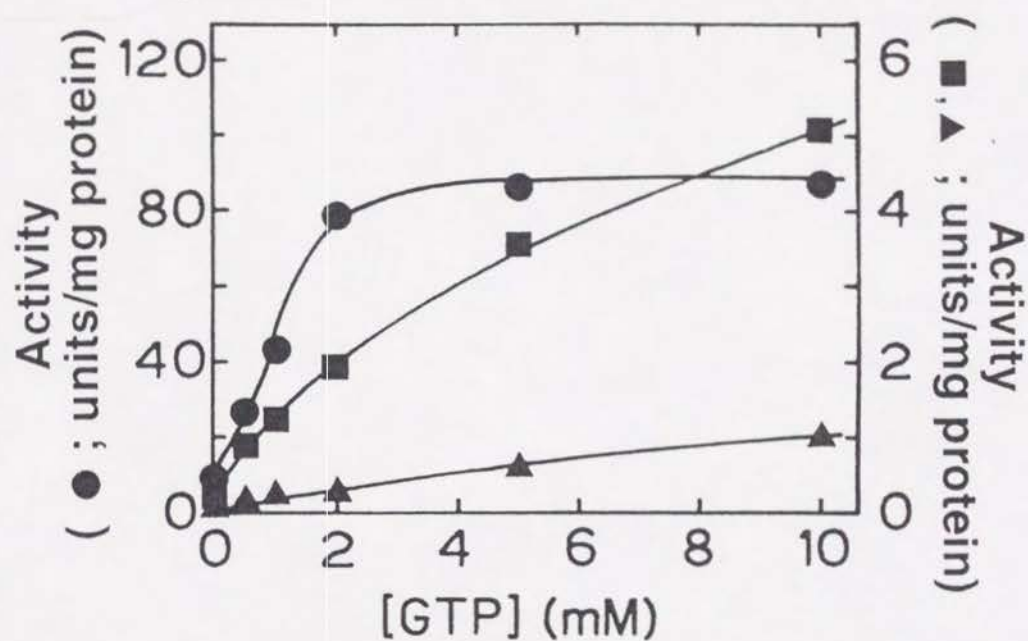


図3.5 H579N (■)、H579P (▲) および野生型酵素 (●) の GTP に対する飽和曲線

野生型酵素は均一標品を、各変異型酵素は部分精製標品を用いた。反応条件は、図3.3に同じ。

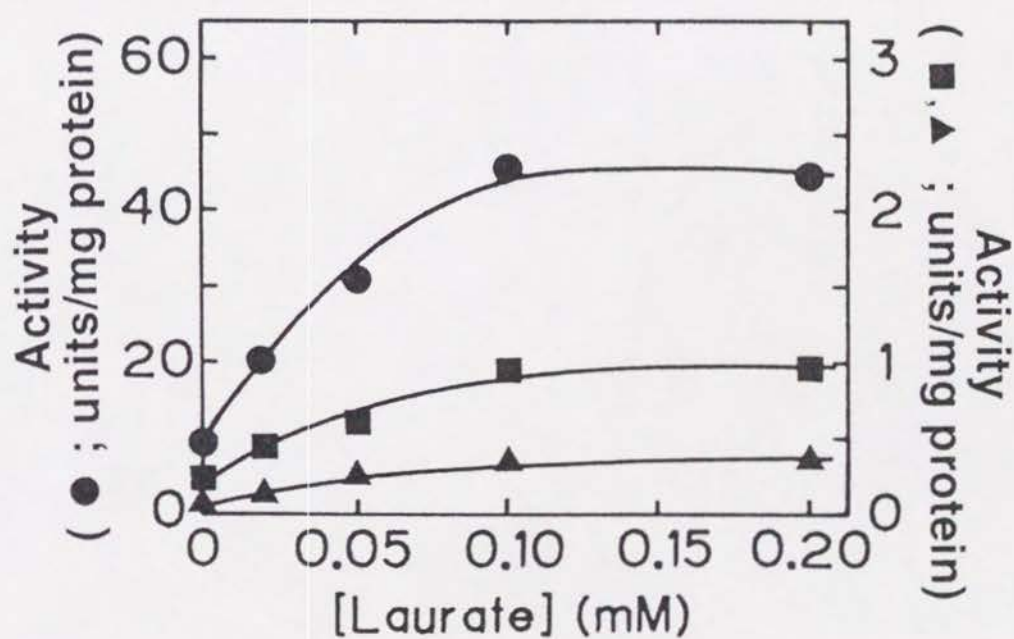


図3.6 H579N (■)、H579P (▲) および野生型酵素 (●) のラウリン酸に対する飽和曲線

野生型酵素は均一標品を、各変異型酵素は部分精製標品を用いた。反応条件は、図3.3に同じ。

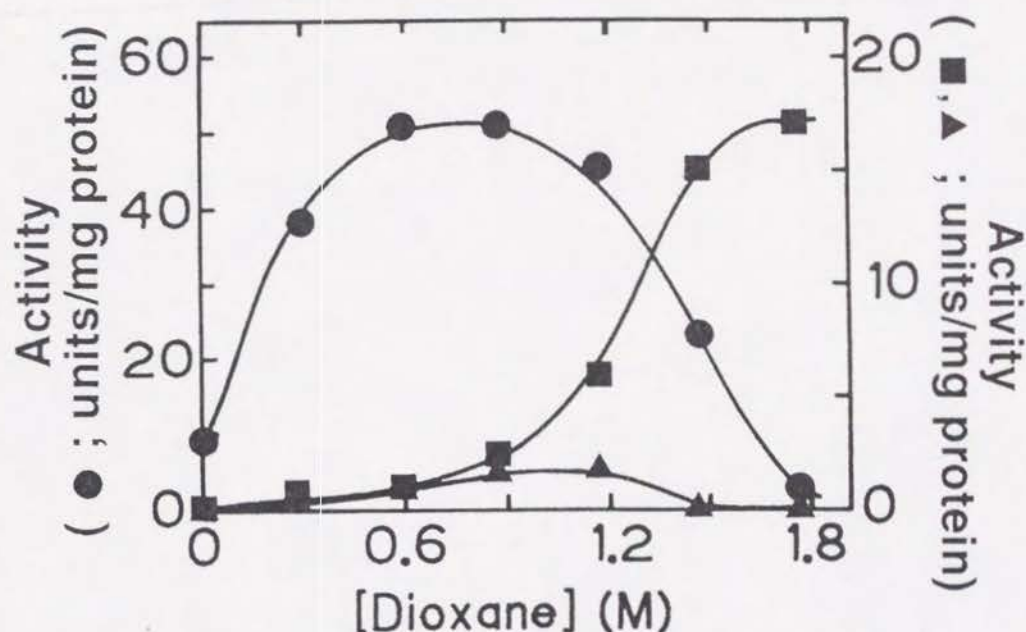


図3.7 H579N (■)、H579P (▲) および野生型酵素 (●) のジオキサンに対する飽和曲線

野生型酵素は均一標品を、各変異型酵素は部分精製標品を用いた。標準反応混液中で測定した。

の $A_{0.5}$ は野生型酵素で 0.18 M、H579N で 1.4 M、H579P で 0.53 M であった。ジオキサンは、これまでラウリン酸などの長鎖脂肪酸と同様の作用によって活性化をもたらすと考えられてきた。しかしながら、ラウリン酸とジオキサンが、変異型酵素で異なった挙動を示したことは、有機溶媒の作用機作に関する研究を進める上で非常に興味深い知見である。

図3.8は、阻害因子であるアスパラギン酸の阻害曲線を 2 mM PEP、1 mM CoASAc 存在下で求めたものである。50% 阻害を引き起こすに要するアスパラギン酸の濃度 $I_{0.5}$ は、野生型酵素では 1.5 mM であったが、変異型酵素でもほぼ同程度であった。しかしながら、阻害曲線の形は異なり、野生型酵素では CoASAc 存在下では強い協同性 (Hill 係数 $n = 2.7$) を示すのに対して、H579N および H579P の Hill 係数はそれぞれ 1.9 と 1.6 と小さくなっていた。

以上の結果を表1.5にまとめた。図3.3-3.5、3.7で示したように、CoASAc、FBP、GTP、ジオキサンは、変異型酵素を活性化するのに、野生型酵素よりも高い濃度が必要であった。以上の実験では各変異型酵素の部分

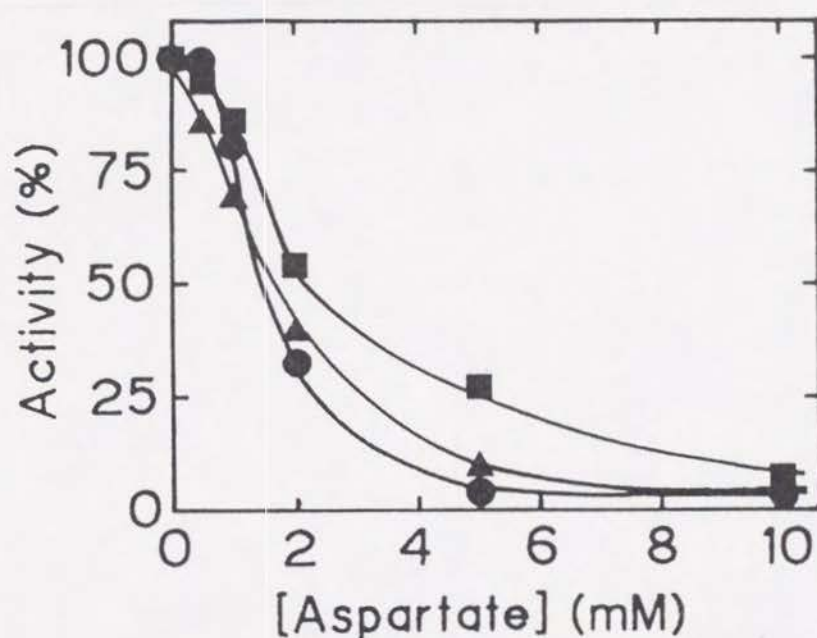


図3.8 H579N (■)、H579P (▲) および野生型酵素 (●) のアスパラギン酸に対する阻害曲線

標準反応混液中の PEPの濃度は 2 mMに変更し、1 mM CoASAcを加えて測定した。

表1.5 野生型酵素とH579N、H579Pのアロステリックな性質

	Wild-type		H579N		H579P	
	V_{ra} (mM)	$A_{0.5}$ (mM)	V_{ra} (mM)	$A_{0.5}$ (mM)	V_{ra} (mM)	$A_{0.5}$ (mM)
CoASAc	100	0.05	29	1.4	5.4	1.4
FBP	100	0.50	4.6	6.0	0.71	2.7
GTP	100	1.2	8.5	6.0	1.9	6.5
Laurate	100	0.03	2.1	0.03	0.79	0.03
Dioxane	100	180	33	1400	3.7	530
		$I_{0.5}$ (mM)		$I_{0.5}$ (mM)		$I_{0.5}$ (mM)
Aspartate		1.5		2.5		1.5

*部分精製標品を用いたので、表示したエフェクターが無量大濃度の時に達成される相対的な最大速度を、野生型酵素の最大速度を100%として示した。エフェクターによる反応速度の増加分とエフェクター濃度の両逆数プロットを外挿することによって値を得た。

精製標品を用いているため相対的な最大速度 (V_r) を示した。これは、変異型酵素では活性化因子非存在下での活性が非常に低く (すなわち活性化因子に対する依存性が非常に強くなっていた)、活性化因子非存在下の活性を基準として何倍活性化されたのか表示するには誤差が大変大きくなるためである。H 5 7 9 N の CoASAc と ジオキサン による V_r は、野生型酵素のそれぞれ 29% と 33% であり最も高かった。これに対して FBP、GTP、ラウリン酸の V_r は野生型酵素の 10% 以下であり、最大速度にも置換による影響が及んでいるものと思われる。H 5 7 9 P の V_r は全て野生型酵素の 0.7 - 5% であった。活性化因子の半飽和濃度 $A_{0.5}$ が野生型酵素の 28 倍と最も増大していたのは CoASAc であり、FBP と GTP のときはそれぞれ 5 倍と 12 倍であった。また、ラウリン酸の $A_{0.5}$ と アスパラギン酸の $I_{0.5}$ はほとんど変わっていなかった。

(4) ジエチルピロカーボネートによる変異型酵素の失活

化学修飾による実験から必須と考えられるヒスチジン残基が His579 以外にも存在するの否かを検討するために、His579 を置換した変異型酵素を用いて化学修飾を行った。一般にジエチルピロカーボネートは、弱酸性条件下でヒスチジン残基を特異的に修飾することが知られている¹³⁵⁾。そこで His579 を置換した各変異型酵素と 1 mM のジエチルピロカーボネートを 0.1 M 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.0) 中で反応させたところ、擬一次反応的に失活した (図 3.9)。このとき変異型酵素は、野生型酵素よりも早く失

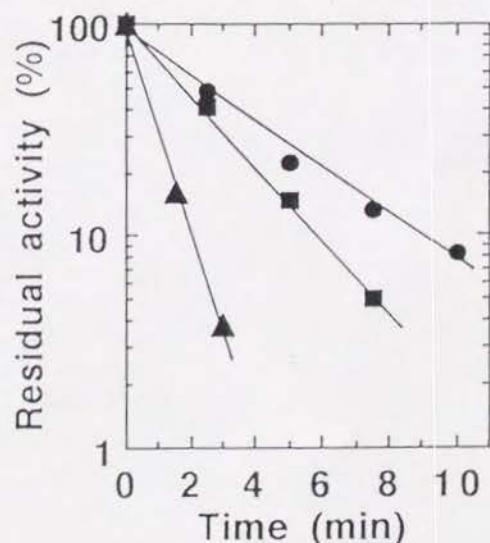


図 3.9 ジエチルピロカーボネートによる野生型酵素 (●)、H 5 7 9 N (■)、H 5 7 9 P (▲) の失活

各変異型酵素の部分精製標品 (80 μ g) を 1 mM のジエチルピロカーボネートと 0.1 M 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.0) 中 30°C で反応させた。反応はジエチルピロカーボネートの添加により開始し、経時的に反応液の一部を取り出し、50 mM のアセチルヒスチジンで反応を停止して、活性を測定した。

活していた。したがって各変異型酵素は His579をもたないにもかかわらず失活したことになり、この残基以外にもヒスチジン残基が活性部位もしくはその近傍に存在していると考えられる。トウモロコシ酵素のジエチルピロカーボネートによる修飾実験では、サブユニット当り2個のヒスチジン残基が、活性部位もしくはその近傍に存在するものと推測されている³⁰⁾。

III-6 His138置換体の酵素学的性質

(1) ピルビン酸生成活性の検出

His138を Asnに置換した H 1 3 8 N は、大腸菌 F15株の発育を支えることができず、精製酵素も全く活性を失っていた。この原因を明らかにする手がかりを得るために、PEPCの反応機構を考察してみた。序論で述べたように、PEPCの反応機構としては、段階的反応機構モデル³¹⁾が最も可能性が高い。この反応モデルに従うと、2段階の部分反応のうちのどちらかの部分反応が失われても、オキサロ酢酸を生成できないことになる。もし一段階目の部分反応によって、カルボキシリン酸とピルビン酸のエノール型アニオンが生成し、二段階目の部分反応が失われていれば、2つの中間体は酵素の活性中心から解離した後、非酵素的な水分子による分解を受けて無機リン酸とピルビン酸を生成することになる(図40)。これに対して、

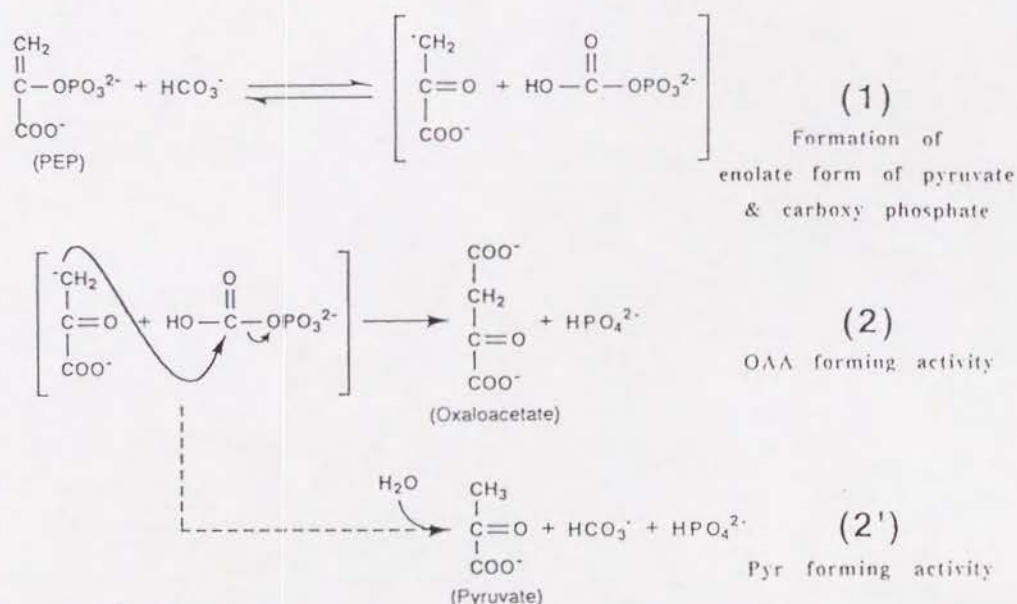


図40 PEPCの段階的反応機構モデル

一段階目の部分反応で生成した2つの中間体が加水分解を受けると、無機リン酸とピルビン酸を与えることを示す(2')。

一段階目の部分反応が失われていれば2つの中間体は生成しないこととなり、無機リン酸とピルビン酸も生成しない。ただし、この場合には二段階目の部分反応の有無を調べる方法がないので、一段階目の部分反応だけが失われたのか2つの部分反応とも失われたのかは区別できないことになる。

まずH138Nの均一精製標品を用いて、H138Nがオキサロ酢酸を生成する触媒活性を完全に失っていることを確認した(表16)。このときPEPの酵素への親和性を高めるためにCoASAc(2 mM)をアクチベーターとして標準反応混液に加えた。さらに、野生型酵素の活性測定で用いる通常の酵素量よりも約100倍量(終濃度33 μ g/ml)に増やしてH138Nの活性測定を行った。しかしながら、この場合も有意な酵素活性は検出されなかった($<1.9 \times 10^{-5}$ units/mg)。野生型酵素がこの活性測定条件下で146 units/mgの比活性を有するのに対して、H138Nの比活性は、ただか 1.3×10^{-5} に過ぎず、測定誤差と考えられた。したがってH138Nは完全に酵素活性を失っていたことになる。

そこでH138Nが一段階目の部分反応を触媒できるか否かを確かめるために、標準反応混液中のmalate dehydrogenaseの代わりにlactate dehydrogenaseを共役酵素として用いて、分光学的にピルビン酸生成の有無を検討した(表16)。するとH138Nは2 mM CoASAc存在下で0.47 units/mgのピルビン酸生成活性を有していることが観察された(表16)。PEPCの正規の反応(オキサロ酢酸生成触媒活性)で活性化因子として働く

表16 H138Nが示すピルビン酸生成活性の検出

H138Nの均一精製標品(33 μ g)を用いて、標準反応混液中(全容1 ml)で活性測定を行った。CoASAcを加えるときは2 mM添加した。

Assayed activities	CoASAc added	Activity (nmol \cdot min $^{-1}$ \cdot mg $^{-1}$)
Oxaloacetate forming activity	+	<1.9
	—	<1.7
Pyruvate forming activity	+	470
	—	2.3

CoASAcを反応混液から除くと、H 1 3 8 Nのビルビン酸生成活性は 2.3×10^{-3} units/mgと著しく減少した。したがってH 1 3 8 Nのビルビン酸生成反応は、野生型酵素のオキサロ酢酸生成反応と同様に CoASAcによって活性化されているものと考えられた。表には示さなかったが、酵素標品を 95°C で5分間加熱処理するとビルビン酸生成活性は全くみられず、この反応が酵素的なものであることが示された。PEPからビルビン酸生成を触媒する酵素としては解糖系の pyruvate kinaseがよく知られている。しかしながら、ここで用いた酵素標品は電気泳動的に均一であり、pyruvate kinaseの反応には ADPを要求するので、この酵素の混在による可能性は完全に否定される。もう一つの可能性としては混在する phosphataseによる PEPの分解が考えられるが、ビルビン酸の生成触媒反応が CoASAcによって活性化されたことを説明するのは困難である。ビルビン酸の生成反応がこれらの混在酵素によるものではなく、H 1 3 8 N自身の触媒作用であることを、さらに確かめるために HCO_3^- と Mg^{2+} の依存性を調べた。

表17に示すように、活性測定混液から HCO_3^- を除くとH 1 3 8 Nのビルビン酸生成活性は著しく抑えられた。したがって、H 1 3 8 Nのビルビン酸生成触媒反応は HCO_3^- に依存していることが示された。 KHCO_3 を加えない場合にも、わずかながらビルビン酸の生成活性がみられたが、これは材

表17 H 1 3 8 Nの示すビルビン酸生成活性の所要因子

完全反応混液は 5 mM PEP、50 mM Tris- H_2SO_4 (pH 8.0)、10 mM KHCO_3 、10 mM MgSO_4 、0.1 mM NADH、7.5 IU lactate dehydrogenase、1.17 M ジオキサンおよび酵素を含む。

Conditions	Pyruvate forming activity (nmol·min ⁻¹ ·mg ⁻¹)
Complete	430
-Enzyme ^a	0
-PEP	0
- KHCO_3	<5.6
- MgSO_4	0

^a 熱失活酵素

料と方法 (II-9) に記したような注意を払っても、外部からの HCO_3^- の混入を完全には防ぎきれなかったためと思われる。反応混液から Mg^{2+} を除いたときには、まったくビルビン酸生成活性はみられなかった。したがって H 1 3 8 N は、一段階目の部分反応によって 2 つの中間体を生成するものの、二段階目の部分反応が失われているためにオキサロ酢酸を生成できず、2 つの中間体の加水分解によってビルビン酸と無機リン酸を生成しているものと結論された。

さらに、H 1 3 8 N の示した反応において、ビルビン酸と無機リン酸の生成との間に化学量論が成立するか否かを確認するため、酵素反応液から経時的にサンプリングを行い、ビルビン酸と無機リン酸の定量を行った。このとき、ジオキサンをアクチベーターとして用いた。図 4 1 に示すように、それぞれの反応時間においても遊離した無機リン酸のモル数は、生成したビルビン酸のモル数に等しかった。

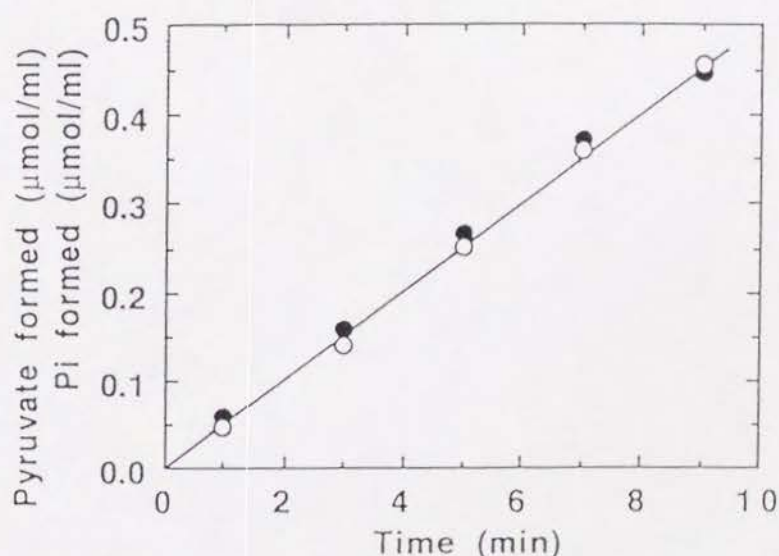


図 4 1 H 1 3 8 N によって PEP から遊離した無機リン酸と生成したビルビン酸の量

反応混液 (全容 4 ml) は、5 mM PEP、0.1 M Tris-酢酸 (pH 8.5)、10 mM 酢酸マグネシウム、10 mM KHCO_3 、1.17 M ジオキサンおよび 50 $\mu\text{g/ml}$ の H 1 3 8 N を含む。30°C で反応を行い、表示した時間に反応液から 0.5 ml を取り出し、70% 過塩素酸 0.25 ml を加えて反応を停止し、無機リン酸 (○) の定量を行った。ビルビン酸 (●) の定量は、表示した時間に 50 μl を取り出して、lactate dehydrogenase を用いた分光学的方法によって行った。

(2) 速度論的性質

H138Nが示したピルビン酸生成反応の速度論的性質を調べるため、PEPに対する飽和曲線を CoASAc存在下および非存在下で求めた(図42)。このとき、それぞれの飽和曲線の両逆数プロットはともに直線性を示していた。活性化因子のないときの最大速度 V_{max} は 2.8×10^{-2} units/mgであり、PEPに対する半飽和濃度 K_m は 36.0 mMであった。CoASAc (2mM) を加えたときの V_{max} は 1.43 units/mg、PEPに対する K_m は 11.4 mMと、CoASAcによって著しく活性化されていた。2 mM CoASAc存在下のこれらの速度論的パラメーターを、野生型酵素の正規の反応のもの(表14)と比較すると、 V_{max} は野生型酵素の約1%であり、 K_m は約70倍に増大していた。したがって、His138の Asnへの置換は、二段階目の部分反応を失わせただけでなく、PEPに対する見かけの親和性にも大きな影響を与えているものと考えられる。

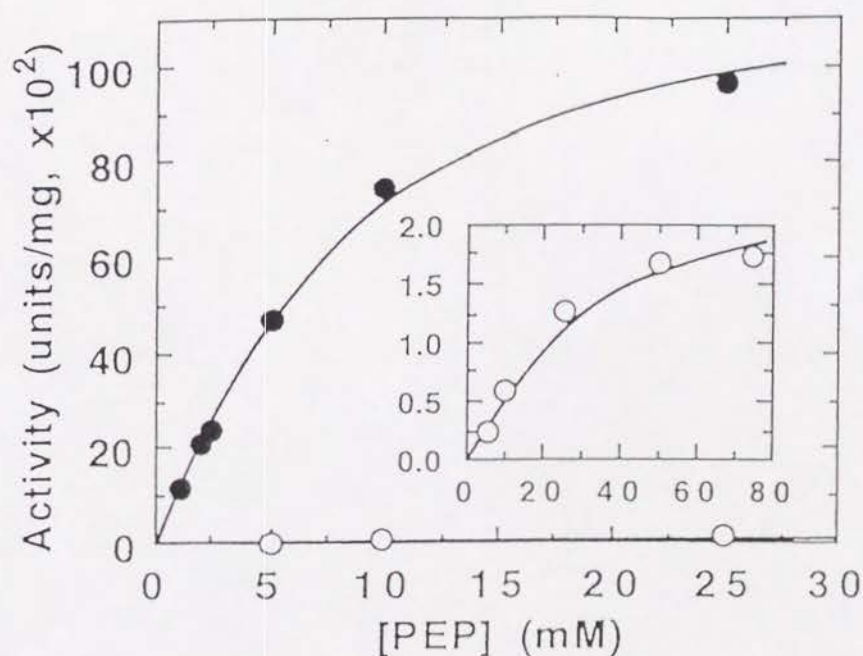


図42 H138Nの PEPの飽和曲線

活性測定は lactate dehydrogenaseを共役酵素とした標準反応測定混液中で、活性化因子非存在下(○)もしくは2 mM CoASAc存在下(●)で行った。(挿入図)活性化因子非存在下(○)における飽和曲線の拡大図。

(3) アロステリック・エフェクターに対する感受性

表18は、野生型酵素の正規の反応におけるエフェクター存在下での、H138Nの示すピルビン酸生成活性を調べたものである。H138Nの活性はCoASAcとジオキサンによって著しく活性化されていた。そのほか、FBP、GTP、ラウリン酸によっても活性化がみられた。CoASAcによる活性化はアスパラギン酸の添加によって打ち消されており、H138Nのピルビン酸生成活性でもアスパラギン酸は阻害因子として働いていると考えられた。したがって、H138Nの炭酸水素イオンに依存したピルビン酸生成反応は、野生型酵素の正規の反応と同じように、これらのエフェクターによって制御されることを示している。

表18 H138Nのピルビン酸生成活性のエフェクターに対する感受性

標準反応混液 (lactate dehydrogenaseを含む) に、表に示した濃度のエフェクターを加えて活性測定を行った。

Additions	Pyruvate forming activity (nmol·min ⁻¹ ·mg ⁻¹)
None	2.3
CoASAc (2 mM)	470
CoASAc (1 mM)+Aspartate (2 mM)	2.7
Dioxane (1.17 M)	910
FBP (10 mM)	17
GTP (10 mM)	19
Laurate (0.2 mM)	34

第 IV 章 考 察

本論文では、PEPCの触媒能および制御能において重要な役割を担っていると考えられるヒスチジン残基の同定を目指して、2つの保存性ヒスチジン残基を他のアミノ酸残基に置換した変異型酵素を得て、以下のことを示した。

(1) 大腸菌 PEPCの保存性ヒスチジン残基の1つである His579を Asnもしくは Proに置換した変異型酵素を調製して、速度論的解析を行い、His579が触媒機能に不可欠ではないが重要であることを示した。

(2) もう1つの保存性ヒスチジン残基 His138を Asnに置換した変異型酵素は、完全に触媒機能を喪失するが、炭酸水素イオンに依存した PEPの加水分解反応を行うことを示した。

これらの結果を基に、2つの保存性ヒスチジン残基が果たす役割について考察を行う。

さらに伊島理枝子氏と赤坂一之先生（京大・理）との共同研究で、大腸菌酵素の¹H-NMRによる解析を行ったところ2つの保存性ヒスチジン残基と基質アナログとの直接的な相互作用が示唆された（参考論文1）¹³⁷⁾。このことは本研究で2つのヒスチジン残基の役割を考察する上で重要な知見と考えられるので、参考のために考察の最後にデータの一部を示しながら述べる。

IV-1 His579の役割

大腸菌 PEPCの His579周辺の配列は、10種類の PEPCを通じて保存性が非常に高く（図12）、PEPCに特徴的な配列であった。この領域は Gly-Arg-Gly-Glyという配列が2回繰り返して現れており、柔軟性に富んだグリシン残基と、リン酸基と結合できる塩基性のアルギニン残基やヒスチジン残基が存在している¹¹¹⁾。一般にヌクレオチドのリン酸基の結合部位は柔軟で曲がり易いループ構造であることが報告されているが¹³⁸⁾、PEPCにみられる繰り返し配列の二次構造もランダムコイルとβ-ターンと予想されることから⁹⁷⁾、PEPの結合部位であると推測されていた¹¹¹⁾。また活性部位近傍に位置すると考えられる Cys568も、この繰り返し配列に近い³²⁾。

こうした推測をもとに、PEPの結合における His579の役割を検討するため 2つの変異型酵素 H 5 7 9 NとH 5 7 9 Pを調製し、その性質を調べてきた。

置換による高次構造への影響を考察してみると、H 5 7 9 Nはアスパラギン残基の窒素原子がイミダゾール環の1位の窒素原子と相同な位置にあるために¹³⁹⁾、穏やかな置換であることが期待された(図43参照)。



図43 ヒスチジン残基とアスパラギン残基の側鎖の比較

実際に H 5 7 9 Nの熱安定性は野生型酵素に匹敵していた(図24、25参照)。これに対して、H 5 7 9 Pは、プロリン残基が α -ヘリックスなどを破壊することが多いために高次構造に影響を与えると予想され、熱安定性も野生型酵素に比べると著しく低下していた(図24参照)。2つの変異型酵素は、置換による高次構造への影響が異なるものの、共に4量体構造を保持しており、イオン交換クロマトグラフィーでの挙動から表面電荷に違いはなく、大きな高次構造の変化は生じていないものと考えられた。

2つの変異型酵素の部分精製標品を用いた実験では、H 5 7 9 Nの最大速度が野生型酵素の29%であり、H 5 7 9 Pが5.4%であった。このことより PEPCの触媒能において、His579は不可欠でないことが明らかになった。H 5 7 9 Nの均一標品を用いると、最大活性が野生型酵素の69%であり、置換によって触媒反応の活性化エネルギーが8.7 kJ/mol増加したことになる。基質とコファクターなどのリガンドの半飽和濃度のうちで、野生型酵素と変異型酵素で特に大きな違いがみられたのは PEPに対する半飽和濃度である。¹H-NMRからも His579と基質間の直接的相互作用が示唆されている(後述)。したがって、His579は PEPの結合に部分的に寄与しているものと考えられる。

H 5 7 9 NとH 5 7 9 Pの pHプロファイルは野生型酵素と本質的に同じであった。本研究室では His579を Gluもしくは Lysに置換した変異型酵素を

も調製して、その性質を検討している。この2つの変異型酵素H579EとH579Kは至適pHが野生型酵素と異なり、H579Eが酸性側に、H579Kが塩基性側にシフトしていた(参考論文1)¹³⁷⁾。通常、活性中心の残基の荷電状態に影響を与えるような残基は、より酸性の残基に置換されると、プロトン化した活性中心残基を安定化することが知られている。すると活性中心残基のpKa値は増大することとなり、至適pHが塩基性側にシフトする。逆に、より塩基性の残基に置換されるとpKa値を減少させて至適pHを酸性側にシフトさせることになる。こうした置換による至適pHのシフトは、実験的にも subtilisin¹⁴⁰⁾や trypsin¹⁴¹⁾で確かめられている。しかしH579EとH579Kは、これとちょうど反対の至適pHのシフトを引き起こしたことになる。579番目に位置する残基がプラスマイナス何れを問わず、電荷をもたない方が都合のよいように思われる。この現象を単純なモデルで説明することは、現時点では困難であるがHis579の役割を考える上で興味深い知見と考えられる。

アロステリック・エフェクターに対する感受性も、変異型酵素は野生型酵素と大きく異なっていた。なかでも CoASAcに対する半飽和濃度が最も増大していた。これに対して長鎖脂肪酸のラウリン酸の半飽和濃度 $A_{0.5}$ が、置換によって、まったく影響を受けていなかった。活性化機構が同じと考えられていた長鎖脂肪酸(ラウリン酸)と有機溶媒(ジオキサン)の感受性が、変異型酵素で異なっていたことも興味深い。これら2つの活性化因子の作用機作は、必ずしも同じではないことが示された。さらに、活性化因子の濃度が無限大の時に達成される最大速度が、CoASAcやジオキサンに比べて、FBP、GTP、ラウリン酸で著しく低下していた。野生型酵素ではCoASAcなどの活性化因子によるアロステリック効果が、主としてPEPに対する見かけの親和性を増加させることによって発現されており、最大速度の増加は数倍程度であることを考えると¹⁴²⁾、興味深い知見であると思われる。

His579の置換が触媒能と制御能の両方に影響を与えた理由は現時点では不明であるが、1つの可能性として、His579がPEPの結合に関与しており、触媒部位においてエフェクターからの制御情報を伝達する役割を果たし

ているのかもしれない。別の可能性として His579の置換がアロステリックな平衡をシフトさせて、より不活性な T 状態へと導いている可能性が考えられる。

IV - 2 His138の役割

PEPCの保存性 His138を Asnに置換するだけで、PEPからオキサロ酢酸を生成できなくなることが示された。変異型酵素は PEPの分解を行ってビルビン酸および無機リン酸を生成することが明かとなった。この反応には、野生型酵素と同様、 Mg^{2+} および HCO_3^- が必須であった。この知見は、PEPCの触媒する反応は正規の基質である PEPを用いたときにも、カルボキシリン酸の生成反応とカルボキシル基の転移反応の2つの部分反応から成り立ち、2つの部分反応を切り離し得ることを示すものである。また、PEPCの触媒能において必須とされてきたヒスチジン残基をはじめて同定したこととなり、His138が二段階目の部分反応に必須であることを明らかに示したものである。

PEPCの触媒する反応が少なくとも2段階の部分反応から成り立つことは、以前、本研究室の藤田らが PEPのホモログであるホスホエノール- α -ケト酪酸の分解反応から提唱した⁸⁴⁾。藤田らの知見とは独立に $[^{13}C]HCO_3^-$ の同位体効果⁸²⁾や反応に伴うリン原子のまわりの立体配置の反転⁸³⁾からも、段階的反応機構が“もっともらしい機構”として提唱されている。

段階的反応機構では2つの中間体としてカルボキシリン酸とビルビン酸のエノール型アニオンの形成が想定されていた。ホスホエノール- α -ケト酪酸の脱リン酸化反応では、少なくとも α -ケト酪酸のエノール型アニオンが酵素の活性中心から脱離していることが示されていることから⁸⁵⁾、PEPを基質としたときにもビルビン酸のエノール型アニオンが形成していることは確実である。PEPのアナログやホモログは、おもに大腸菌酵素¹⁴³⁾とトウモロコシの酵素¹⁴⁴⁾を中心に検討されてきた。このなかでも特に C_3 位の水素原子をハロゲンに置換したホモログは、炭酸固定反応と脱リン酸化反応の両方を受けていることが、トウモロコシの酵素で報告されている。(2)-3-フルオロホスホエノールビルビン酸¹⁴⁵⁾と (2)-3-クロロホスホエノ

ールビルビン酸¹⁴⁸⁾では、3-ハロビルビン酸と 3-ハロオキサロ酢酸を 4:1もしくは3:1の割合で生成することが示されている。さらにトウモロコシの酵素では、PEPを基質とした反応でも数%が脱リン酸化を受けてビルビン酸を生成していると報告されている¹⁴⁹⁾。これらのホモログの構造を総合して考えると、PEPの C₃位にメチル基もしくはハロゲン原子が導入されることにより、PEPの2段階目の部分反応が簡単に喪失されることになる。反応性に富む2つの中間体を、活性中心で安定に形成するためには、2段階目の部分反応が起きる部位は疎水的なポケットであることが要請される。メチル基やハロゲン原子が、この部位を物理的に占めることにより、2段階目の部分反応を喪失させたり損なわせたりしているものと推測されている^{84, 144)}。

H138Nが2段階目の部分反応を喪失していた理由の一つとしては、Asnへ置換したことによって活性中心の疎水的な環境が破壊された可能性が考えられる。これは、His138を疎水的なアミノ酸残基に置換した変異型酵素がオキサロ酢酸を生成できるか検討することにより明かとなるであろう。しかしながら、H138Nの熱安定性は野生型酵素と本質的に変わらなかったことから、疎水的な環境を破壊している可能性はきわめて薄い。むしろ、His138が二段階目の部分反応であるカルボキシルの転移反応の触媒機構で何等かの決定的な役割を果たしていると考えるのが自然である。これに関連して、野生型酵素でホスホエノール- α -ケト酪酸の分解の時にみられた¹⁸Oの無機リン酸へ多重取り込み (isotope scrambling) 現象が、H138Nでもみられるか検討することは興味深い。

PEPCの反応ではリン酸基のまわりの立体配置の反転が起こることから、PEPのリン酸基の遠位から炭酸水素イオンが攻撃していることが知られている⁸³⁾。したがって、カルボキシリン酸もしくは活性化されたカルボキシル基は、ビルビン酸のエノール型アニオンの C₃位へと向きをかえなければならない。このとき、His138はカルボキシリン酸からカルボキシル基を一時的に預かって、ビルビン酸のエノール型アニオンのカルボキシル化を可能にしていると考えられる。または His138が一般塩基として、カルボキシル基の転移反応でカルボキシリン酸のリン酸基を引きつけて、反応を円滑に

進めさせている可能性も考えられる。

カルボキシリン酸が反応中間体として想定されている酵素は PEPC 以外に carbamoyl phosphate synthetase⁽⁴⁷⁾ とビオチンを補因子とするいくつかの carboxylase⁽⁴⁸⁾ がある (図 4.4)。カルボキシリン酸が実際に反応中間体であることを証明する最も直接的な方法は、反応中間体を捕捉することである。カルボキシリン酸は、中性の水溶液中での半減期が 70 msec と見積られており⁽⁴⁹⁾、実際に carbamoyl phosphate synthetase の反応でジアゾメタンによってトリメチルエステルもしくは KBH_4 による還元でギ酸として捕捉されている^(50, 51)。しかし、ジアゾメタンによるカルボキシリン酸の捕捉は PEPC⁽⁴⁾、ビオチン酵素の pyruvate carboxylase⁽⁵²⁾ と acetyl-CoA carboxylase⁽⁵³⁾ で試みられたがすべて失敗している。この理由としては、カルボキシリン酸が生成したとしても、ジアゾメタンと反応しえない状態にあるか、そのままの形で活性中心に安定にとどまらずにただちに分解されるか、他の中間体に変換されるのではないかと想像される。PEPC では 180 の多重取り込みの現象を説明する 1 つの仮説として、生成し

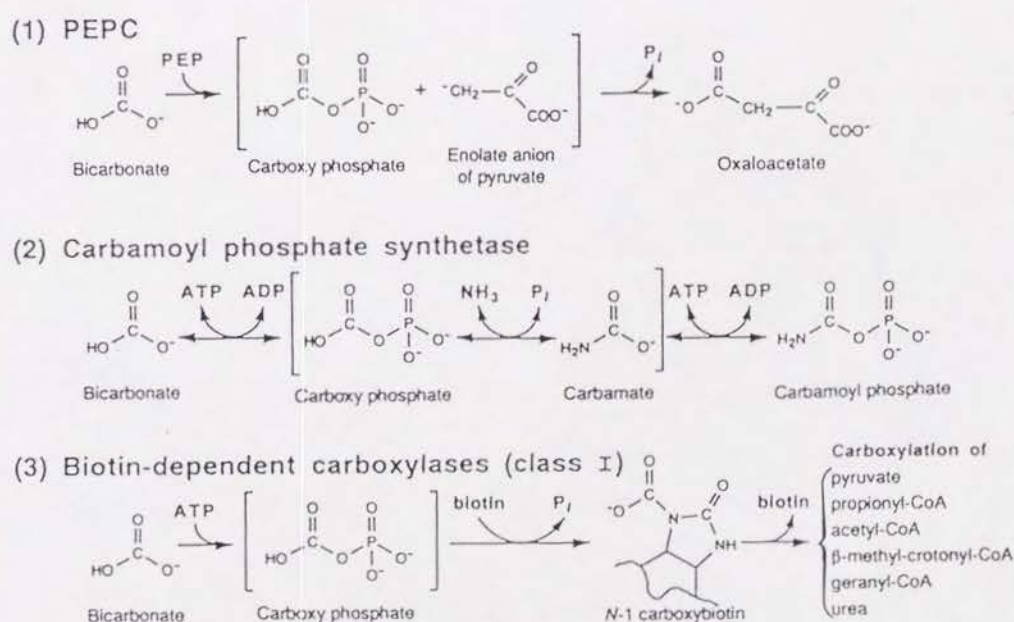


図 4.4 HCO_3^- を用いる酵素で提唱されている反応機構の類似性

たカルボキシリン酸からリン酸基もしくはカルボキシル基が転移して、酵素の活性中心のイミダゾール基などに可逆的に結合する過程が考えられている¹⁵⁴⁾。His138がもしもこのようなイミダゾール基であるとすれば、一段階目の部分反応だけを行うH138Nは、活性中心においてカルボキシリン酸が安定に存在できることとなり、この中間体を捕捉できる可能性が高いものと期待される。

IV-3 $^1\text{H-NMR}$ による PEPCの解析の試み

本教室のグループ（伊島理枝子氏と赤坂一之先生、京大・理）との共同研究であるが、本研究にとって重要な知見であるので、実験データを示しながらその結果をここに記す。 $^1\text{H-NMR}$ は近年、超伝導磁石の導入によってその性能が飛躍的に向上したが、PEPCは分子量が約10万のサブユニット4つからなる大きな酵素であるためにスペクトルの分離は期待できず、多くの成分が重なり合ったブロードなシグナルが予想された。しかし、ヒスチジン残基のイミダゾール環の $\text{C}_2\text{-H}$ プロトンだけは、ピークとして観察されるものと期待された。実際に、野生型酵素の一次元スペクトルを注意深くみると、7.7 ppmと7.9 ppm付近に2つのヒスチジン残基の C_2 プロトンが比較的鋭いピークとして観察された（図45WT、aとbのピーク）。pHを変化させてこれら2つのピークの挙動を調べてみたが、この領域周辺のシグナルはさまざまな pK_a 値のヒスチジン残基の C_2 プロトンから成り立っていることが明かとなり、 pK_a 値を決定できなかった。大腸菌酵素にはヒスチジン残基が13カ所存在しているが、一次元スペクトルで観察された2つのピークがどの残基に対応しているか手がかりを得るために、H138NとH579Nのスペクトルをとって野生型酵素のものと比較してみた（図45）。すると、H579Nでは低磁場側のaと示したピークが消失しており、H138Nでは高磁場側のbと示したピークが低減していた。したがって、His579がaのピークに、His138がbのピークに対応しているものと考えられた。大腸菌酵素の13カ所のヒスチジン残基の中でも、これら2つの保存性ヒスチジン残基周辺の予想二次構造は柔軟性に富む領域と考えられるが、 $^1\text{H-NMR}$ スペクトル上で比較的鋭いピークを与えた

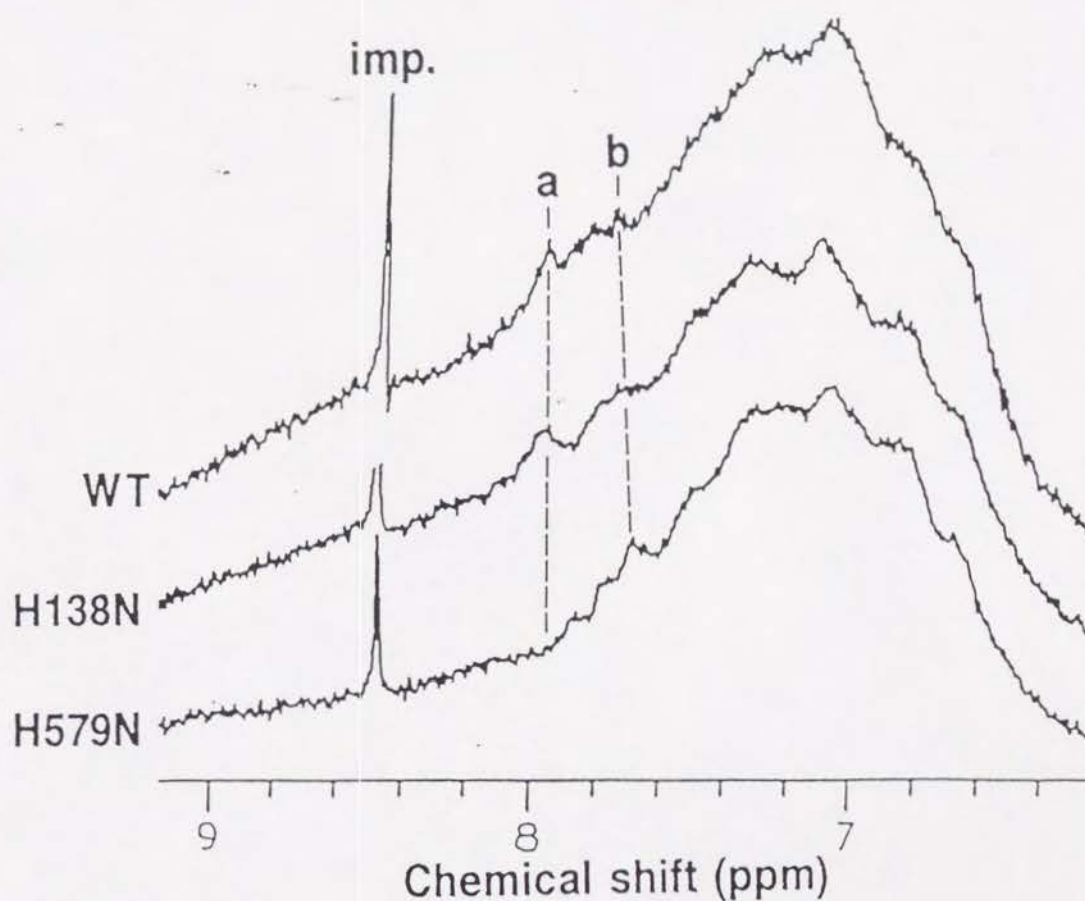


図4.5 野生型(WT)、変異型 PEPCの芳香族領域の 400-MHz ^1H -NMR スペクトル

測定は各変異型酵素 (4–10 mg/ml) を含む 10 mM リン酸カリウム / 5 % (v/v) 1,4-ジオキサン- d_6 / $^2\text{H}_2\text{O}$ (pH 8.2) 中、35°Cで行った。ピーク a (7.9 ppm) は His579 の、ピーク b (7.7 ppm) は His138 の C_2 プロトンである。imp. 不純物。試料は以下のように前処理を行った。各酵素標品 (2–5 mg) を D_2O に溶かし、Centricon 30 微量濃縮装置を用いて 3 回 D_2O に溶媒交換した。その後さらに上記の装置を用いて 10 mM リン酸カリウム緩衝液 / D_2O (pH 7.5) に 2 回交換して、全容を約 0.5 ml とした。試料を NMR 用のサンプル管に移して D_2SO_4 もしくは NaOD で pH を調整した。 ^1H -NMR スペクトルは JEOL 社製の 400-MHz の GX400 スペクトロメーターで測定し、全ての化学シフトは内部基準として試料中に加えた 3- (トリメチルシリル) プロピオネート-2,2,3,3- $^2\text{H}_4$ (TSP) からの ppm で表した。図のスペクトルは、総計 2 秒間の 90° のパルス波を 500–2000 回加えて得られたものである。

ことはこの予想と符合する。

次に PEPのアナログの 3,3-ジクロロ-2-ヒドロキシフィノイルメチル-2-プロペノエート (DCDP、図 4 6 参照) が、野生型酵素の NMR スペ

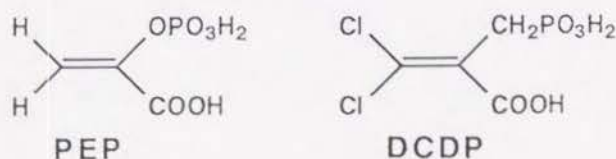


図 4 6 3,3-ジクロロ-2-ヒドロキシフィノイルメチル-2-プロペノエート (DCDP) と PEP の構造

クトルにどのような影響を及ぼすか検討した。DCDPはトウモロコシ酵素の拮抗阻害剤としてみいだされたが¹⁵⁵⁾、大腸菌酵素でも PEPの半飽和濃度とほぼ同じ阻害定数を有して拮抗阻害することを確認している。図 4 7 は DCDP非存在下の NMR スペクトルから、DCDPを添加したときのスペクトルを差し引いた差スペクトルを示している。さきに同定された 2 つの保存性ヒスチジン残基に対応する位置 (8.0 ppm と 7.8 ppm、図 4 5 と異なるのは pH 7.4 で実験を行っているためにシフトしているものと考えられる) に、アナログ濃度に比例して差スペクトル上でピークとして明瞭に観察された。このことは DCDP の結合にともなって、2 つのピークがブロードニングしていることを意味する。7.1 ppm と 7.2 ppm 付近に負のピークが DCDP の濃度に比例して観察されるが、これは 2 つの保存性ヒスチジン残基のピークがシフトしていることを意味するのかもしれない。これら 4 つのピークは半飽和濃度が 0.5 - 1.3 mM の範囲で飽和する傾向がみられ、阻害実験により求めた阻害定数 ($K_i = 0.5 \text{ mM}$) とよく一致していた。したがって、2 つのヒスチジン残基は PEP と直接的な相互作用を行っているものと推測された。この推測の是非は、変異型酵素を用いた同様の実験で明かとなるものと考えられる。

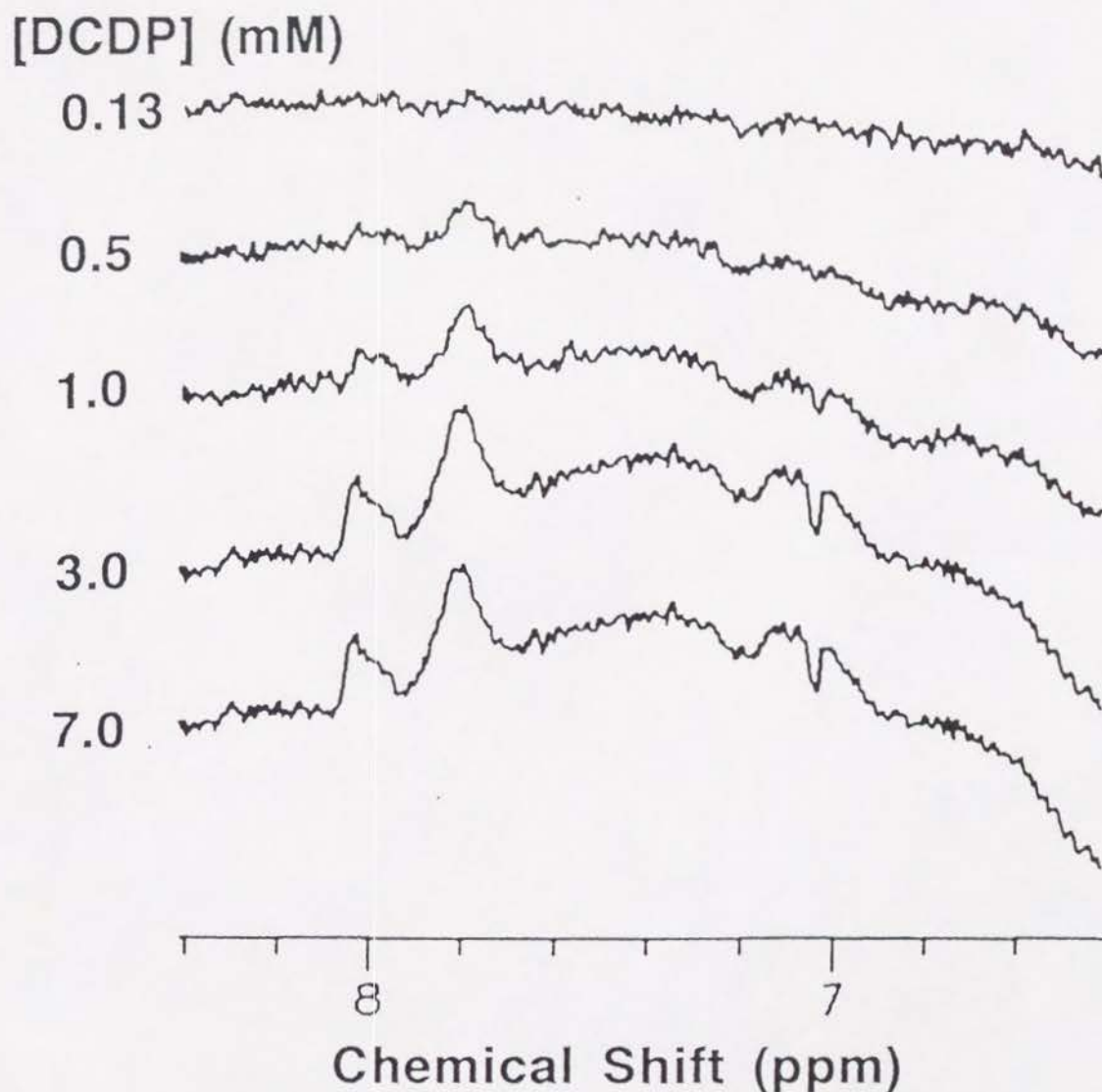


図4-7 3,3-ジクロロ-2-ジヒドロキシフオスフィニルメチル-2-プロペノエート (DCDP) による PEPCの滴定

DCDP非存在下のスペクトルから図の左側に示した DCDP濃度でのスペクトルを差し引いた差スペクトルを示す。測定は野生型酵素 (14.7 mg) を含む 20 mM リン酸カリウム緩衝液/4% (v/v) 1,4-ジオキサン- d_6 /5 mM $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (pH 7.4) に DCDPを加えて 25°Cで行った。試料の前処理と測定条件は図4-2と同じである。DCDPは住友化学・宝塚総合研究所の宮本純之博士、金丸博博士に御供与頂いた。

謝 辞

本研究を進めるにあたり終始御指導下さいました、泉井桂助教授に深く感謝申し上げます。また多方面にわたり貴重な御助言を下さり、1990年10月に逝去されました徳重正信教授に感謝申し上げると同時に心より御冥福をお祈り申し上げます。博士学位申請論文を作成するにあたり、有益な御助言と御尽力を下さいました、鈴木仁美教授に感謝申し上げます。大腸菌 F15株を御供与下さいました Vrije大学の Nicolas Glansdorff博士、3,3-ジクロロ-2-ジヒドロキシフオスフィノイルメチル-2-プロペノエート (DCDP) の合成を快く引き受けて下さった住友化学宝塚総合研究所の宮本純之博士、金丸博博士に御礼申し上げます。Eckstein法による部位特異的変異の導入に関して有益な御助言を頂きました大阪大学産業科学研究所の二井將光教授、能見貴人博士、並びに変異導入用オリゴヌクレオチドの合成をして頂きました住友化学生命工学研究所の大川秀郎博士、藪崎義康博士に深く感謝致します。PCR法で用いた4本のオリゴヌクレオチドの合成にあたり御協力を下さった京都大学農学部の山田康之教授、佐藤文彦博士に御礼申し上げます。最後に、いろいろと御助言、御協力下さいました、湯元昇博士ならびに河田康志博士、その他、研究室の皆様に深く感謝致します。

参考文献

- 1) Utter, M. F. and Kolenbrander, H. M. (1972) in "The Enzymes" (Boyer, P. D. ed.), vol.5, pp.117-168, Academic Press, New York
- 2) Hutchinson, III, C. A., Phillips, S., Edgel, M. H., Gillam, S., Jahnke, P. and Smith, M. (1978) J. Biol. Chem. 253, 6551-6560
- 3) Itakura, K., Rossi, J. J. and Wallace, R. B. (1984) Ann. Rev. Biochem. 53, 323-356
- 4) 真壁 理 (1986) 「遺伝子研究法 I (続生化学実験口座 1)」、日本生化学会編、東京化学同人、pp.1-33
- 5) Zoller, M. J. and Smith, M. (1983) Methods Enzymol., 100, 468-500
- 6) Kramer, B., Kramer, W. and Fritz, H.-J. (1983) Cell 38, 579-889
- 7) Zoller, M. J. and Smith, M. (1984) DNA 3, 479-488
- 8) Kramer, W., Drusta, V., Jansen, H.-W., Kramer, B., Pflugfelder, M. and Fritz, H.-J. (1984) Nucleic Acids Res. 12, 9441-9456
- 9) Carter, P., Bedouelle, H. and Winter, G. (1985) Nucleic Acids Res. 13, 4431-4443
- 10) Kunkel, T. A. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 488-492
- 11) Taylor, J.W., Ott, J. and Eckstein, F. (1985) Nucleic Acids Res. 13, 8765-8785
- 12) Nakamaye, K. L. and Eckstein, F. (1986) Nucleic Acids Res. 14, 9679-9698
- 13) Taylor, J. W., Schmidt, W., Cosstik, R., Okruszek, A. and Eckstein, F. (1985) Nucleic Acids Res. 13, 8749-8764
- 14) Oligonucleotide-directed *in vitro* mutagenesis system (Handbook) (1986) code RPN. 2322, Amersham International, Amersham, U.K.
- 15) Higuchi, R. (1989) in "PCR Technology" (Erlich, H. A. ed.), pp.61-70, Stockton Press, New York
- 16) Ho, S. N., Hunt, H. D., Horton, R. M., Pullen, J. K. and Pease, L. R. (1989) Gene 77, 51-59
- 17) Gerlt, J. A. (1987) Chem. Rev. 87, 1079-1105
- 18) Fersht, A. R. Wells, T. N. C. and Leatherbarrow, R. J. (1986) Nature 322, 284-286
- 19) Fersht, A. R. Wells, T. N. C. and Leatherbarrow, R. J. (1987) Biochemistry 26, 6030-6038

- 20) Lowe, D. M., Winter, G. and Fersht, A. R. (1987) *Biochemistry* 26, 6038-6034
- 21) Fersht, A. R. (1987) *Biochemistry* 26, 8031-8037
- 22) Fersht, A. R., Knill-Jones, J. W., Bedouelle, H. and Winter, G. (1988) *Biochemistry* 27, 1581-1587
- 23) Gardell, S. J., Craik, C. S., Hilvert, D., Urdea, M. S. and Rutter, W. J. (1985) *Nature* 317, 551-555
- 24) Hilvert, D., Gardell, S. J., Rutter, W. J. and Kaiser, E. T. (1986) *J. Am. Chem. Soc.* 108, 5298-5304
- 25) Ikehara, M., Ohtsuka, E., Tokunaga, T., Nishikawa, S., Uesugi, S., Tanaka, T., Aoyama, Y., Kikyodani, S., Fujimoto, K., Yanase, K., Fuchimura, K. and Morioka, H. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 4695-4699
- 26) Nishikawa, S., Morioka, H., Fuchimura, K., Tanaka, T., Uesugi, S., Ohtsuka, E. and Ikehara, M. (1986) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 138, 789-794
- 27) Monod, J., Wyman, J. and Changeux, J.-P. (1965) *J. Mol. Biol.* 12, 88-118
- 28) Koshland, D. E., Jr., Nemethy, G. and Filmer, D. (1966) *Biochemistry* 5, 365-385
- 29) Krause, K. L., Voltz, K. W. and Lipscomb, W. N. (1987) *J. Mol. Biol.* 193, 527-553
- 30) Kim, K. H., Pan, Z., Honzatko, R. B., Ke, H.-M. and Lipscomb, W. N. (1987) *J. Mol. Biol.* 196, 853-875
- 31) Katrowitz, E. R. and Lipscomb, W. N. (1990) *Trends Biochem. Sci.* 15, 53-59
- 32) Eisenstein, E., Markby, D. W. and Schachman, H. K. (1990) *Biochemistry* 29, 3724-3731
- 33) Newton, C. J. and Katrowitz, E. R. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 2309-2313
- 34) Xu, G.-X., Vilet, F., Ladjimi, M. M., Wannemaeker, B., Staercke, C., Glansdorff, M., Pierard, A., Cunin, R. and Herve, G. (1991) *J. Mol. Biol.* 220, 789-799
- 35) Schirmer, T. and Evans, P. R. (1990) *Nature* 343, 140-145
- 36) Berger, S. A. and Evans, P. R. (1990) *Nature* 343, 575-576
- 37) Sprang, S. R., Acharya, K. R., Goldsmith, E. J., Stuart, D. I., Varvill, K., Fletterick, R. J., Madsen, N. B. and Johnson, L. N. (1988) *Nature* 336, 215-221
- 38) Sprang, S., Goldsmith, E. and Fletterick, R. (1987) *Science* 237, 1012-1019

- 39) Goldsmith, E. J., Sprang, S. R., Hamlin, R., Xuong, N-H. and Fletterick, R. J. (1989) *Science* 245, 528-532
- 40) Barford, D. and Johnson, L. N. (1989) *Nature* 340, 609-616
- 41) O'Leary, M. H. (1982) *Annu. Rev. Plant Physiol.* 33, 297-315
- 42) Andreo, C. S., Gonzalez, D. H. and Iglesias, A. A. (1987) *FEBS Lett.* 213, 1-8
- 43) Tchen, T. T., Loewus, F. A. and Vennesland, B. (1955) *J. Biol. Chem.* 213, 547-555
- 44) 香月祐彦、泉井桂、寺岡弘文、吉永侃夫、森川実 (1973) *生化学* 45, 781-803
- 45) Theodore, T. S. and Englesberg, E. (1964) *J. Bacteriol.* 88, 946-955
- 46) Kornberg, H. L. (1965) *Symp. Soc. Gen. Microbiol.* 15, 8
- 47) Hatch, M. D. and Slack, C. R. (1970) *Annu. Rev. Plant Physiol.* 21, 141-162
- 48) Osmond, C. B. (1978) *Annu. Rev. Plant Physiol.* 29, 379-414
- 49) Willmer, C. M. (1983) *Physiol. Veg.* 21, 943-953
- 50) Edwards, G. and Walker, D. A. (1983) in "C3, C4: Mechanisms and Cellular and Environmental Regulation of Photosynthesis", Blackwell Scientific Publication, Oxford, pp.479-493
- 51) Canvas, J. L. and Kornberg, H. L. (1965) *Biochim. Biophys. Acta* 96, 169-172
- 52) Maeba, P. and Sanwal, B. D. (1965) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 21, 503
- 53) Sanwal, B. D. and Maeba, P. (1966) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 22, 194-199
- 54) Izui, K., Nishikido, T., Ishihara, K. and Katsuki, H. (1970) *J. Biochem.* 68, 215-226
- 55) Taguchi, M., Izui, K. and Katsuki, H. (1977) *FEBS Lett.* 77, 270-272
- 56) Izui, K., Yoshinaga, T., Morikawa, M. and Katsuki, H. (1970) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 40, 949-956
- 57) Nishikido, T., Izui, K., Iwatani, A., Katsuki, H. and Tanaka, S. (1968) *J. Biochem.* 63, 532-541
- 58) Yoshinaga, T., Teraoka, H., Izui, K. and Katsuki, H. (1974) *J. Biochem.* 75, 913-924
- 59) Morikawa, M., Izui, K. and Katsuki, H. (1971) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 45, 689-694

- 60) Morikawa, M., Izui, K. and Katsuki, H. (1977) *J. Biochem.* 81, 1473-1485
- 61) Teraoka, H., Izui, K. and Katsuki, H. (1972) *Arch. Biochem. Biophys.* 152, 821-827
- 62) Kameshita, I., Tokushige, M. and Katsuki, H. (1978) *J. Biochem.* 84, 795-803
- 63) Naide, A., Izui, K., Yoshinaga, T. and Katsuki, H. (1979) *J. Biochem.* 85, 423-432
- 64) Teraoka, H., Izui, K. and Katsuki, H. (1974) *Biochemistry* 13, 5121-5128
- 65) 村田卓也 (1987) 京都大学大学院理学研究科 昭和61年度修士学位論文
- 66) Uedan, K. and Sugiyama, T. (1976) *Plant Physiol.* 57, 906-910
- 67) Budde, R. J. and Chollet, R. (1986) *Plant Physiol.* 82, 1107-1114
- 68) Nimmo, G. A., McNaughton, G. A. L., Fewson, C. A. Wilkins, M. B. and Nimmo, H. G. (1987) *FEBS Lett.* 213, 18-22
- 69) Jiao, J.-A. and Chollet, R. (1988) *Arch. Biochem. Biophys.* 261, 409-417
- 70) Nimmo, G. A., Nimmo, H. G., Fewson, C. A. and Wilkins, M. B. (1984) *FEBS Lett.* 178, 199-203
- 71) Wu, H.-X. and Wedding, R. T. (1985) *Plant Physiol.* 77, 667-675
- 72) Brulfert, J., Vidal, J., Le Marechal, P., Gadal, P., Queiroz, O., Kluge, M. and Kruger, I. (1986) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 136, 151-159
- 73) Nimmo, G. A., Nimmo, H. G., Hamilton, I. D., Fewson, C. A. and Wilkins, M. B. (1986) *Biochem. J.* 239, 213-220
- 74) Jiao, J.-A. and Chollet, R. (1991) *Plant Physiol.* 95, 981-985
- 75) Terada, K., Kai, S., Okuno, S., Fujisawa, H. and Izui, K. (1990) *FEBS Lett.* 259, 241-244
- 76) Jiao, J.-A. and Chollet, R. (1990) *Arch. Biochem. Biophys.* 283, 300-305
- 77) Jiao, J.-A., Vidal, J., Echevarria, C. and Chollet, R. (1991) *Plant Physiol.* 96, 297
- 78) Jiao, J.-A., Echevarria, C., Vidal, J. and Chollet, R. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 2712-2715
- 79) Carter, P. J., Nimmo, H. G., Fewson, C. A. and Wilkins, M. B. (1991) *EMBO J.* 10, 2063-2068

- 80) Maruyama, H., Easterday, R. L., Chang, H.-C. and Lane, M. D. (1966)
J. Biol. Chem. 241, 2405-2412
- 81) Miller, R. S., Mildran, A. S., Chang, H.-C., Easterday, R. L., Maruyama, H. and
Lane, M. D. (1968) J. Biol. Chem. 243, 6030-6040
- 82) O'Leary, M. H., Rife, J. E. and Slater, J. D. (1981) Biochemistry 20, 7308-7314
- 83) Hansen, D. E. and Knowles, J. R. (1982) J. Biol. Chem. 257, 14795-14798
- 84) Fujita, N., Izui, K., Nishino, T. and Katsuki, H. (1984) Biochemistry 23,
1774-1779
- 85) Gonzalez, D. H. and Andreo, C. S. (1988) Biochemistry 27, 177-183
- 86) Teraoka, H., Naito, S., Izui, K. and Katsuki, H. (1972) J. Biochem. 71, 157-160
- 87) Kameshita, I., Tokushige, M., Izui, K. and Katsuki, H. (1979) J. Biochem. 86,
1251-1310
- 88) Ishijima, S., Izui, K. and Katsuki, H. (1986) J. Biochem. 99, 1299-1310
- 89) Iglesias, A. A. and Andreo, C. S. (1984) Photosynth. Res. 5, 215-226
- 90) Iglesias, A. A. and Andreo, C. S. (1984) Biochim. Biophys. Acta 749, 9-17
- 91) Taghizadeh, S. K., Jacoby, F. J. and Grover, S. D. (1991) Plant physiol. 95,
1237-1242
- 92) Iglesias, A. A., Gonzalez, D. H. and Andreo, C. S. (1984) Biochim. Biophys. Acta
788, 41-47
- 93) Rustin, P., Meyer, C. P. and Wedding, R. T. (1988) J. Biol. Chem. 263,
17611-17614
- 94) Podesta, F. E., Iglesias, A. A. and Andreo, C. S. (1986) Arch. Biochem. Biophys.
246, 546-553
- 95) Jiao, J.-A., Podesta, F. E., Chollet, R., O'Leary, M. H. and Andreo, C. S.
(1990) Biochim. Biophys. Acta 1041, 291-295
- 96) Sabe, H., Miwa, T., Kodaki, T., Izui, K., Hiraga, S. and Katsuki, H. (1984)
Gene 31, 279-283
- 97) Fujita, N., Miwa, T., Ishijima, S., Izui, K. and Katsuki, H. (1984)
J. Biochem. 95, 909-916
- 98) Kodaki, T., Katagiri, F., Asano, M., Izui, K. and Katsuki, H. (1985)
J. Biochem. 97, 532-539

- 99) Katagiri, F., Kodaki, T., Fujita, N., Izui, K. and Katsuki, H. (1985)
Gene 38, 265-269
- 100) Izui, K., Ishijima, S., Yamaguchi, Y., Katagiri, F., Murata, T., Shigesada, K., Sugiyama, T. and Katsuki, H. (1986) Nucleic Acids Res. 14, 1615-1628
- 101) Yanagisawa, S., Izui, K., Yamaguchi, Y., Shigesada, K. and Katsuki, H. (1987) FEBS Lett. 229, 107-110
- 102) O'Regan, M., Thierbach, G., Bachmann, B., Villeval, D., Lepage, P., Viret, J.-F. and Lemoine, Y. (1989) Gene 77, 237-251
- 103) Eikmanns, B. J., Follettie, M. T., Griot, M. U. and Sinskey, A. J. (1989)
Mol. Gen. Genet. 218, 330-339
- 104) Cretin, C., Keryer, E., Tagu, D., Lepiniec, L., Vidal, J. and Gadai, P. (1990)
Nucleic Acids Res. 18, 658
- 105) Cretin, C., Santi, S., Keryer, E., Lepiniec, L., Tagu, D., Vidal, J. and Gadai, P. (1991) Gene 99, 87-94
- 106) Rickers, J., Cushman, J. C., Michalowski, C. B., Scmitt, J. M. and Bohnert, H. J. (1989) Mol. Gen. Genet. 215, 447-454
- 107) Cushman, J. C. and Bohnert, H. J. (1989) Nucleic Acids Res. 17, 6745-6746
- 108) Cushman, J. C. and Bohnert, H. J. (1989) Nucleic Acids Res. 17, 6743-6744
- 109) Koizumi, N., Sato, F., Terano, Y. and Yamada, Y. (1991) Plant Mol. Biol. 17, 535-539
- 110) 泉井桂、香月祐彦 (1986) 細胞工学 5, 478-489
- 111) Ishijima, S., Katagiri, F., Kodaki, T., Izui, K., Katsuki, H., Nishikawa, K., Nakashima, H. and Ooi, T. (1985) Biochem. Biophys. Res. Commun. 133, 436-441
- 112) Farber, G. K. and Petsko, G. A. (1990) Trends Biochem. Sci. 15, 228-234
- 113) Lebioda, L. and Stec, B. (1988) Nature 336, 683-686
- 114) Inoue, M., Hayashi, M., Sugimoto, M., Harada, S., Kai, Y., Kasai, N., Terada, K. and Izui, K. (1989) J. Mol. Biol. 208, 509-510
- 115) Clark, V. M. and Kirby, A. J. (1963) Biochim. Biophys. Acta 78, 732
- 116) Simon, E. J. and Shemin, D. (1953) J. Am. Chem. Soc. 75, 2520
- 117) Tubbs, P. K. and Gerland, P. B. (1969) Methods Enzymol. 13, 535-551

- 118) Cunin, R., Boyen, A., Pouels, P., Glansdorff, M. and Crabeel, M. (1975) *Mol. Gen. Genet.* 140, 51-60
- 119) Low, B. (1968) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 60, 160-167
- 120) Messing, J. (1983) *Methods Enzymol.* 101, 20-78
- 121) Yanisch-Perron, C., Vieira, J. and Messing, J. (1985) *Gene* 33, 103-119
- 122) Schimmel, P. (1990) *Biochemistry* 29, 9495-9502
- 123) Roth, J. R. (1970) *Methods Enzymol.* 17A, 3-35
- 124) Anraku, Y. (1967) *J. Biol. Chem.* 242, 793-800
- 125) Teraoka, H., Nishikido, T., Izui, K. and Katsuki, H. (1970) *J. Biochem.* 67, 567-575
- 126) Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989) "Molecular cloning: a laboratory manual" 2nd edn, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- 127) 重定勝哉 (1983) *細胞工学* 2, 616-626
- 128) Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463-5467
- 129) Bradford, M. (1976) *Anal. Biochem.* 72, 248-254
- 130) Yoshinaga, T., Izui, K. and Katsuki, H. (1970) *J. Biochem.* 68, 747-750
- 131) Wadelin, C. and Mellon, M. G. (1953) *Anal. Chem.* 25, 1668-1673
- 132) 依田篤信 (1955) *日本化学雑誌* 80, 488-490
- 133) Izui, K., Fujita, N. and Katsuki, H. (1982) *J. Biochem.* 92, 423-432
- 134) Ishijima, S., Fujita, N., Sabe, H., Izui, K. and Katsuki, H. (1984) *J. Gen. Appl. Microbiol.* 30, 27-33
- 135) Laemmli, U. K. (1970) *Nature* 227, 680-685
- 136) 大野素徳、金岡祐一、崎山文夫、前田浩 (1981) 「蛋白質の化学修飾・上 (生物化学実験法 12)」、瓜谷郁三、志村憲助、中村道德、船津勝編、学会出版センター、pp.85-108
- 137) 寺田和豊、船引宏則、泉井桂 (1991) 第42回蛋白質構造討論会予稿集 pp.5-8
- 138) Moller, W. and Amons, R. (1985) *FEBS Lett.* 186, 1-7

- 139) Lowe, D. M., Fersht, A. R. and Wilkinson, A. J. (1985) *Biochemistry* 24, 5106-5109
- 140) Russell, A. J. and Fersht, A. R. (1987) *Nature* 328, 496-500
- 141) Sprang, S., Standing, T., Fletterick, R. J., Stroud, R. M., Finner-Moore, J., Xuong, N.-H., Hamlin, R., Rutter, W. J. and Craik, C. S. (1987) *Science* 237, 905-909
- 142) Izui, K. (1970) *J. Biochem.* 68, 227-238
- 143) Izui, K., Matsuda, Y., Kameshita, I., Katsuki, H. and Woods, A. E. (1983) *J. Biochem.* 94, 1789-1795
- 144) Gonzalez, D. H. and Andreo, C. S. (1989) *Trends Biochem. Sci.* 14, 24-27
- 145) Diaz, E., O'Laughlin, J. T., and O'Leary, M. H. (1988) *Biochemistry* 27, 1336-1341
- 146) Liu, J., Peliska, J. A. and O'Leary, M. H. (1990) *Arch. Biochem. Biophys.* 277, 143-148
- 147) Meister, A. (1989) *Adv. Enzymol.* 62, 315-374
- 148) Knowles, A. (1989) *Annu. Rev. Biochem.* 58, 195-221
- 149) Sauers, C. K., Jencks, W. P. and Groh, S. (1975) *J. Am. Chem. Soc.* 97, 5546-5553
- 150) Powers, S. G. and Meister, A. (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73, 3020-3024
- 151) Powers, S. G. and Meister, A. (1978) *J. Biol. Chem.* 253, 1258-1265
- 152) Wallace, J. C., Phillips, N. B., Snoswell, M. A., Goodall, G. J., Attwood, P. V. and Keech, D. B. (1985) *Ann. NY Acad. Sci.* 447, 169-188
- 153) Ogita, T. and Knowles, J. R. (1988) *Biochemistry* 27, 8028-8033
- 154) 藤田信之 (1984) 京都大学大学院理学研究科 昭和58年度博士学位論文
- 155) Jenkins, C. L. D., Harris, R. L. N. and McFadden, H. G. (1987) *Biochem. Int.* 14, 219-226